

DESCRIPTION

sc(Fv)2 STRUCTURAL ISOMERS

5

Technical Field

The present invention relates to pharmaceutical compositions comprising sc(Fv)2 and methods for producing the compositions.

10 Background Art

sc(Fv)2s are single-chain antibodies in which two light chain variable regions (VL) and two heavy chain variable regions (VH), four variable regions in total, are linked by linkers or such (Hudson *et al.*, *J Immunol. Methods* (1999) 231 : 177-189).

For example, single-chain antibodies having the sequence

15 VH₁-linker-VL₂-linker-VH₃-linker-VL₄ or VL₂-linker-VH₁-linker-VL₄-linker-VH₃ are known. Depending on the combination of Fv (a molecule in which VH and VL are non-covalently linked), two types of structural isomers of sc(Fv)2 would exist: sc(Fv)2 in which each set of Fv is formed by VH₁ and VL₂, and VH₃ and VL₄; and sc(Fv)2 in which each set of Fv is formed by VH₁ and VL₄, and VH₃ and VL₂.

20 However, since most previous studies on sc(Fv)2 dealt with bispecific sc(Fv)2s, to date there are almost no reports on structural isomers of sc(Fv)2.

Bispecific sc(Fv)2s are sc(Fv)2s in which the variable regions of VH₁ and VL₄, and VH₃ and VL₂ (or VH₁ and VL₂, and VH₃ and VL₄) in the VH₁-linker-VL₂-linker-VH₃-linker-VL₄ sequence derive from different monoclonal antibodies. In bispecific sc(Fv)2s, VH₁ and VL₄, or
 25 VH₃ and VL₂ (or VH₁ and VL₂, or VH₃ and VL₄) derive from an identical monoclonal antibody. In this case, the efficiency of Fv formation would be higher and therefore the occurrence of structural isomers is suppressed to some extent. In fact, the activity was reported to remain unchanged between bispecific sc(Fv)2s prepared using linkers whose lengths were 15-5-15 and 15-15-15 (Non-patent Document 5). Thus, there is a lack of detailed information regarding
 30 structural isomers of sc(Fv)2. For example, Non-patent Documents 3, 4, 8, and 9 indicate the existence of correct Fv combinations confirmed by measuring bispecific binding activities; however, neither a quantitative evaluation regarding the abundance of incorrect Fv combinations nor abundance ratio between the two has been described. Meanwhile, Non-patent Document 6 demonstrates that structural transition between the monomer and the dimer occurs by alteration
 35 of lengths of bispecific sc(Fv)2 linkers (alteration of the lengths of linkers at the two ends or in the middle). However, when it comes to structural isomers of sc(Fv)2, the document does not

go beyond a discussion on a model-based molecular structure prediction, and describes neither the abundance ratio of the structural isomers nor structural identification in actual samples.

Furthermore, since no attention was focused on structural isomers of sc(Fv)₂, no close examination on regulating structural isomers was conducted. Non-patent Document 10 also predicts that structures of single chain diabody and bivalent scFv are formed when the length of the linkers are 5-15-5 and 15-5-15, respectively. This is because it has been generally reported in scFvs that adjacent VH and VL are unlikely to form an Fv (i.e., a monomer) when the length of the linker is 12 or shorter. However, Non-patent Document 2 reports that a small quantity of monomers is formed even when the length of the linker in the Fv is 10 or 5. Thus, in the case of Non-patent Document 10, where the linker length is 5-15-5 or 15-5-15, the obtained sc(Fv)₂s are not always all in the structural form of single chain diabody or bivalent scFv.

Previous reports evaluated structural isomers by structural prediction based solely upon Fv combinations and linker length. No quantitative analysis of the structural isomer content ratio was conducted. In addition, the obtained structure was not confirmed/verified to see if it was the objective structure. Thus, structural isomers were neither evaluated nor regulated in a sufficient manner. Specifically, regardless of the length, the abundance ratio of the structural isomers of sc(Fv)₂ is extremely difficult to predict based on Fv combinations and linker length. The presence of two types of structural isomers is a issue that has to be taken into consideration when sc(Fv)₂ molecules comprise two pairs of VH and VL.

There are many known separation methods for optical isomers and geometric isomers of minibody compounds. However, to date there are no reported methods for separating protein isomers. Many methods for separating single amino acid variations in proteins have been previously reported; however, to date, no reports on methods for separating two structural isomers comprising a completely identical amino acid primary sequence is known. The same is true for structural isomers of sc(Fv)₂s, and thus, no methods for separating and analyzing, or confirming the two types of structural isomers of sc(Fv)₂ existed in prior art.

Since no method was available for separating structural isomers of sc(Fv)₂, there are no reports focusing on difference in activity between the two types of structural isomers. In bispecific sc(Fv)₂, the activity is obviously predicted to be significantly different between the correct and incorrect Fv combinations within the structural isomers. It is however difficult to predict activity differences between the structural isomers of monospecific sc(Fv)₂s that are divalent as well. Non-patent Document 10 ignores the potential differences in activity between the two structural isomers and measures activity (binding activity) using a mixture of the structural isomers. This is because the activity between each structural isomer of sc(Fv)₂ could not be strictly compared since highly purified structural isomers could not be prepared because of the difficulty in separation and purification of sc(Fv)₂ structural isomers.

Even for sc(Fv)2s with altered linker length, until now it has also been impossible to "identify" (rather than "predict") each of the two types of structural isomers presumed from linker length and to quantitatively evaluate the content ratio of the structural isomers. Thus, to date, no quantitative evaluation has been performed to reveal the relationship between linker length and content ratio of the structural isomers in sc(Fv)2. Therefore, there are substantially no reports describing the regulation of content ratio of structural isomers by altering linker length.

Alteration of linker length results in the alternation of the distance between the two antigen-binding sites in sc(Fv)2, and thus, linker length has a possible influence on biological activity (agonistic activity such as receptor dimerization). It is thus preferable that the distance between the two antigen-binding sites be arbitrarily adjusted by the lengths of the linkers depending on the type of antigen. Furthermore, linker length has been reported to have a great influence on stability (Non-patent Documents 1 and 2) and the stability of scFvs is known to generally decrease as linkers get shorter. The same would be true for sc(Fv)2s. It is reported that dimers are easily formed by shortening the middle linker (Non-patent Document 6). For the preparation of a highly stable sc(Fv)2, linker lengths that can be arbitrarily adjustable are preferred. When sc(Fv)2s are developed as pharmaceuticals, it is thus preferable that target structural isomers be isolated by their arbitrary linker lengths. However, there are no previous reports describing the isolation of each of the two types of structural isomers, bivalent scFv and single chain diabody, from sc(Fv)2s with linkers of arbitrary lengths.

To develop sc(Fv)2s comprising structural isomers as pharmaceuticals, it is necessary to separate and purify only the targeted structural isomer and to manufacture a bulk drug which comprises only one of the structural isomers. Alternatively, when such a bulk drug is a mixture of structural isomers, it is required to determine the properties of the two types of structural isomers and to conduct a specification test to quantitatively analyze the content ratio of the respective structural isomers. However, to date, there are no known methods for separating and purifying, quantitatively analyzing, or identifying the structural isomers of sc(Fv)2s.

Meanwhile, some reports describe methods for controlling the abundance ratio of monomer/dimer/trimer/tetramer of scFv based on linker length. However, to date, there are no reports describing methods for controlling the abundance ratio of structural isomers by altering linker length because no methods for quantitatively analyzing the structural isomers of sc(Fv)2 have been discovered, as described above.

Non-patent Document 1: Protein Engineering, 1993, 6(8), 989-995

Non-patent Document 2: Protein Engineering, 1994, 7(8), 1027-1033

Non-patent Document 3: Journal of Immunology, 1994, 152, 5368-5374

Non-patent Document 4: Journal of Immunology, 1995, 154, 4576-4582

Non-patent Document 5: PNAS, 1995, 92, 7021-7025

Non-patent Document 6: Journal of Molecular Biology, 1999, 293, 41-56

Non-patent Document 7: Protein Engineering, 2001, 14(10), 815-823

Non-patent Document 8: Journal of Molecular Biology, 2003, 330, 99-111

5 Non-patent Document 9: Protein Eng Des Sel. 2004 Apr, 17(4), 357-66

Non-patent Document 10: Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281

Non-patent Document 11: Int. J. Cancer, 1998, 77, 763-772

Disclosure of the Invention

10 [Problems to be Solved by the Invention]

The present invention was achieved in view of such circumstances. An objective of the present invention is to provide, pharmaceutical compositions comprising as an active ingredient a specific structural isomer of sc(Fv)₂, methods for producing the compositions, and methods for determining structure and specification testing of such structural isomers for
15 developing pharmaceuticals. An alternative objective is to provide methods for increasing the proportion of a specific structural isomer in sc(Fv)₂ compositions, methods for increasing the activity of sc(Fv)₂ compositions using such methods, and methods for analyzing the structural isomers in sc(Fv)₂ compositions.

[Means for Solving the Problems]

20 The structural isomers of human Mpl antibody and humanized anti-human Mpl antibody were confirmed to be of single chain diabody type and bivalent scFv type by separating the structural isomers from the sc(Fv)₂ compositions and by cleaving the linker(s) or the region adjacent to the linker(s) of the obtained isomers. In addition, the agonistic activity was found to be markedly different between these structural isomers.

25 The present inventors also discovered that the content ratio of the structural isomers in sc(Fv)₂ compositions can be regulated by altering the linker length of sc(Fv)₂s.

The present invention provides the following [1] to [44]:

[1] a method for producing a pharmaceutical sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:

(a) separating structural isomers in the sc(Fv)₂ composition, and

30 (b) obtaining a specific structural isomer from the separated structural isomers;

[2] a method for producing a pharmaceutical sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:

(a) pre-identifying a structural isomer with higher activity by comparing the activities of structural isomers of sc(Fv)₂;

(b) separating structural isomers in the sc(Fv)₂ composition; and

35 (c) obtaining the structural isomer with higher activity identified in step (a);

[3] a method for producing a pharmaceutical sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:

- (a) determining a linker length so that the structural isomer ratio in an sc(Fv)₂ composition would be of a preferred value;
- (b) preparing a sc(Fv)₂ composition that has the linker length determined in step (a);
- (c) separating structural isomers in the prepared sc(Fv)₂ composition; and
- 5 (d) obtaining a specific structural isomer from the separated structural isomers;
- [4] a method for producing a pharmaceutical sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:
 - (a) preparing multiple sc(Fv)₂ compositions with linkers of varying lengths;
 - (b) selecting an sc(Fv)₂ with linker(s) that give a preferred of structural isomer ratio in an sc(Fv)₂ composition;
- 10 (c) preparing an sc(Fv)₂ composition in which the linker lengths are the same as those of sc(Fv)₂ selected in step (b);
- (d) separating the structural isomers in the prepared sc(Fv)₂ composition; and
- (e) obtaining a specific structural isomer from the separated structural isomers;
- [5] the method of any one of [1] to [4], wherein the structural isomer is of single chain diabody
- 15 type or bivalent scFv type;
- [6] the method of any one of [1] to [5], wherein the structural isomer has an agonistic activity;
- [7] the method of any one of [1] to [6], wherein a linker of sc(Fv)₂ is 15 amino acids in length;
- [8] a pharmaceutical composition prepared by the production method of any one of [1] to [7];
- [9] a pharmaceutical composition, wherein the proportion of a specific structural isomer in an
- 20 sc(Fv)₂ composition is 80% or greater;
- [10] the pharmaceutical composition of [9], wherein the structural isomer is of single chain diabody type or bivalent scFv type;
- [11] the pharmaceutical composition of [9] or [10], wherein the structural isomer binds to a receptor;
- 25 [12] the pharmaceutical composition of any one of [9] to [11], wherein the structural isomer has an agonistic activity;
- [13] the pharmaceutical composition of [9] to [12], wherein a linker of sc(Fv)₂ is 15 amino acids in length;
- [14] a method for controlling the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the step of
- 30 altering the structural isomer proportion in the sc(Fv)₂ composition;
- [15] a method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the step of increasing the proportion of a specific structural isomer in the sc(Fv)₂ composition;
- [16] a method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:
 - (a) separating structural isomers in an sc(Fv)₂ composition;
 - 35 (b) obtaining a specific structural isomer from the separated structural isomers;
- [17] a method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:

(a) pre-identifying a structural isomer with higher activity by comparing the activities of structural isomers of sc(Fv)₂;

(b) separating structural isomers in the sc(Fv)₂ composition; and

(c) obtaining the structural isomer with higher activity that was identified in step (a);

5 [18] a method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:

(a) applying an sc(Fv)₂ composition onto an ion exchange column; and

(b) removing a specific structural isomer;

[19] the method of any one of [14] to [18], wherein the structural isomer is of single chain diabody type or bivalent scFv type;

10 [20] a method for increasing the content ratio of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, which comprises the step of heating the sc(Fv)₂ composition;

[21] the method of [20], wherein the structural isomer is of single chain diabody type or bivalent scFv type;

[22] a method for increasing the content ratio of the single chain diabody type in an sc(Fv)₂ composition, comprising the step of incubating the sc(Fv)₂ composition at 15°C to 50°C;

[23] a method for increasing the content ratio of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, which comprises the step of substituting, with a charged amino acid residue, an amino acid residue at the contact surface of heavy chain and light chain variable regions in the sc(Fv)₂;

20 [24] a method for increasing the content ratio of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, which comprises the step of substituting the following amino acid residues with an amino acid residue having the same type of charge:

(1) the amino acid residue at position 39 in the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and

25 (2) the amino acid residue at position 38 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂;

[25] a method for increasing the content ratio of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, which comprises the step of substituting the following amino acid residues with an amino acid residue having the same type of charge:

(1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and

30 (2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂;

[26] a method for increasing the content ratio of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, which comprises the step of substituting either one of the following amino acid residues with a charged amino acid residue:

35 (1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable

region of sc(Fv)₂; and

(2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂;

[27] a method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition, which comprises the step of substituting, with a charged amino acid residue, an amino acid residue at the contact surface of heavy chain and light chain variable regions of sc(Fv)₂;

[28] a method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition, comprising the step of substituting the following amino acid residues with an amino acid residue having the same type of charge:

(1) the amino acid residue at position 39 in the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and
(2) the amino acid residue at position 38 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂;

[29] a method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition, comprising the step of substituting the following amino acid residues with an amino acid residue having the same type of charge:

(1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and
(2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂;

[30] a method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the step of substituting either one of the following amino acid residues with a charged amino acid residue:
(1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and

(2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂;

[31] a method for suppressing the isomerization of a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, which comprises the step of substituting, with a charged amino acid residue, an amino acid residue at the contact surface of heavy chain and light chain variable regions of sc(Fv)₂;

[32] a method for suppressing the isomerization of a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, comprising the step of substituting the following amino acid residues with an amino acid residue having the same type of charge:

(1) the amino acid residue at position 39 in the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and
(2) the amino acid residue at position 38 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂;

[33] a method for suppressing the isomerization of a structural isomer in an sc(Fv)₂

composition, comprising the step of substituting the following amino residues with an amino acid residue having the same type of charge:

(1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and

5 (2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂;

[34] a method for suppressing the isomerization of a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, comprising the step of substituting either one of the following amino acid residues with a charged amino acid residue:

10 (1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and

(2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂;

[35] a method for controlling the proportion of a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition

15 comprising the step of adjusting the length of a linker in sc(Fv)₂;

[36] the method of [35], wherein the structural isomer is of a single chain diabody type or bivalent scFv type;

[37] a method for increasing the proportion of the single chain diabody type in an sc(Fv)₂ composition, which comprises the step of adjusting the lengths of both end linkers of sc(Fv)₂ to

20 0 to 12 amino acids and the length of the middle linker to 10 to 30 amino acids;

[38] a method for increasing the proportion of the bivalent scFv type in an sc(Fv)₂ composition, which comprises the step of adjusting the lengths of both end linkers of sc(Fv)₂ to 12 to 30 amino acids and the length of the middle linker to 0 to 10 amino acids;

[39] a method for producing an sc(Fv)₂ composition in which the content ratio of a single chain diabody type is 80% or greater, which comprises the step of adjusting the lengths of both end linkers of sc(Fv)₂ to 0 to 12 amino acids and the length of the middle linker to 0 to 10 amino acids;

[40] a method for producing an sc(Fv)₂ composition in which the content ratio of bivalent scFv type is 80% or greater, which comprises the step of adjusting the lengths of both end linkers of sc(Fv)₂ to 12 to 30 amino acids and the length of the middle linker to 0 to 10 amino acids;

[41] a method for analyzing a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, comprising the step of cleaving a linker or a region adjacent to the linker in sc(Fv)₂;

[42] the method of [41], wherein the linker or the region nearby the linker is cleaved by a treatment with an enzyme;

35 [43] the method of [41] or [42], wherein the structural isomer is of a single chain diabody type or bivalent scFv type; and

[44] a method for analyzing a structural isomer in an sc(Fv)2 composition comprising the steps of:

- (a) treating the sc(Fv)2 composition with an enzyme; and
- (b) determining the molecular weight or structure of the product after treatment.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows in (a) a diagram illustrating VH1-linker-VL1-linker-VH2-linker-VL2 structure of VB22B sc(Fv)2, and in (b), a diagram showing the two types of structural isomers of the VH1-linker-VL1-linker-VH2-linker-VL2 structure. This diagram shows the bivalent scFv structure (left) in which VH1 is associated with VL1, and VH2 is associated with VL2; and the single chain diabody structure (right) in which VH1 is associated with VL2, and VH2 is associated with VL1.

Fig. 2 shows results of separation of peak 1 and peak 2 in anion exchange chromatography.

Fig. 3 shows the result of reducing SDS-PAGE of peak 1, peak 2, and VB22B sc(Fv)2 before and after subtilisin treatment. The putative structures for the obtained bands are shown on the right.

Fig. 4 shows a diagram illustrating the difference in the proteolytic pattern after limited proteolysis by subtilisin. The difference results from the structural difference between the bivalent scFv and single chain antibody. In the case of bivalent scFv structure, the low molecular weight antibody fragment is formed, which is boxed with a dotted line.

Fig. 5 shows a result of gel filtration chromatography after limited proteolysis of peak 1, peak 2, and VB22B sc(Fv)2 by subtilisin. The elution position of the low molecular weight antibody peaks are indicated by the arrows.

Fig. 6 shows results of a TPO-like agonistic activity assay of VB22B sc(Fv)2 structural isomers.

Fig. 7 shows results of separating peak 1 and peak 2, using cation exchange chromatography.

Fig. 8 shows peptide mapping of peak 1 and peak 2 which were separated by cation exchange chromatography.

Fig. 9 shows results of reducing SDS-PAGE of peak 1, peak 2, and hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 after subtilisin treatment. The structures of the obtained bands are shown on the right.

Fig. 10 shows results of gel filtration chromatography after limited proteolysis of peak 1, peak 2, and hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 by subtilisin. The elution position of the low molecular weight antibody peak is indicated by the arrows.

Fig. 11 shows results from a TPO-like agonistic activity assay of hVB22B u2-wz4

Comment [MH1]:

低分子化抗体について

. 別件の、X-2373EP(C1-A220P-EP)(貴社ご担当: 矢吹 奈美様)の平成 19 年 1 月 10 日付、弊所コメントにて、

「low-molecular-weight antibody」という言葉は、意味が良く認識できず、読み手が技術的特徴の意味を解釈できず不明確である、という EP 特許庁審査部からの指摘に対する応答案を提示させて頂いております。この件では、「minibody」と、

「low-molecular-weight antibody」の二つの用語が混在していたため補正を比較的容易に行うことが出来ました。

. 従いまして、本件では低分子化抗体を「low-molecular-weight antibody」と訳出することをご希望されていましたが、OA の段階で不明確であるという指摘を受ける可能性を鑑みて、一箇所だけ「minibody」を残しておかれることをお薦めいたします。ご同意頂けます場合には、「minibody」に戻すご希望の箇所をお知らせ下さい。

sc(Fv)2 structural isomers.

Fig. 12 shows a diagram illustrating each construct with modified linker forms. Gxx represents a construct where the length of middle linker is xx. Lxx is a construct where the length of end linkers are xx; the (GGGGS (SEQ ID NO: 11))_n sequence was used for each linker. L8 represents a construct where the GGGGSGGS sequence (SEQ ID NO: 20) is used for both end linkers whose length is 8. L12 represents a construct where the GGGGSGGGGSGS sequence (SEQ ID NO: 21) is used for both end linkers whose length is 12. Pxx represents a construct where the length of middle linker is made into xx using the (GGPGS(SEQ ID NO: 17))_n sequence as a linker.

Fig. 13 shows results of anion exchange chromatography analysis of each modified linker form and the abundance ratio of the obtained structural isomers. The percentage of the bivalent scFv type structure is shown.

Fig. 14 shows chromatograms of hydroxyapatite column and graphs indicating the result of gel filtration chromatography analysis of the purified fractions.

Fig. 15 shows results of chromatographic analysis using SOURCE 15S column.

Fig. 16 shows results of cation exchange chromatography analysis.

Fig. 17 is a photograph presenting results of SDS-PAGE analysis of peak 1 and peak 2 of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 purified on a large scale.

Fig. 18 shows results of gel filtration analysis of peak 1 and peak 2 of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 purified on a large scale.

Fig. 19 shows results of gel filtration chromatography of u2-wz4, and the modified forms v1 and v3.

Fig. 20 shows results of cation exchange chromatography of u2-wz4, and the modified forms ov1 and v3.

Fig. 21 is a photograph presenting results of isoelectric focusing of u2-wz4, purified u2-wz4 peak 1 and peak 2, and the modified forms v1 and v3.

Fig. 22 shows results of gel filtration chromatography analysis of purified u2-wz4 peak 1 and peak 2, and the modified forms v1 and v3 after limited proteolysis using protease.

Fig. 23 shows results of TPO-like agonistic activity assay for purified u2-wz4 peak 1 and peak 2, and the modified forms v1 and v3.

Fig. 24 shows results of DSC analysis of purified u2-wz4 peak 1 and peak 2, and the modified forms v1 and v3.

Fig. 25 shows results of gel filtration chromatography analysis in the heat accelerated test of purified u2-wz4 peak 1 and peak 2, and the modified forms v1 and v3.

Fig. 26 shows results of cation exchange chromatography in the heat accelerated test of purified u2-wz4 peak 1 and peak 2, and the modified forms v1 and v3.

Fig. 27 shows results of separation of peak 1 and peak 2 of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 using cation exchange chromatography.

Fig. 28 shows results of cation exchange chromatography analysis of purified peak 1 and peak 2 of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2.

Fig. 29 shows results of reducing SDS-PAGE of peak 1 and peak 2 of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 after subtilisin treatment. Putative structures of the obtained bands are given on the right.

Fig. 30 shows results of gel filtration chromatography after limited proteolysis of peak 1 and peak 2 of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 with subtilisin. The elution position of the low molecular weight antibody peak is indicated by an arrow.

Fig. 31 shows results of IL-6-neutralizing activity assay for peak 1 and peak 2 of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 in BaF3/gp130.

Fig. 32 shows a chronological increase of peak 2 in anion exchange chromatography analysis using samples of VB22B sc(Fv)2 peak 1 incubated in 20 mM sodium acetate/150 mM NaCl (pH 6.0) at 40°C.

Fig. 33 shows a graph assaying the agonistic activity of peak 1 and peak 2 of VB22B sc(Fv)2, and the samples incubated at 40°C for 6 days. The graph also confirms activity increase by isomerization of peak 1 to peak 2.

Fig. 34 shows isomerization of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak 1 to peak2 by incubating peak 1 at 25°C for 10 days under various conditions.

Best Mode for Carrying Out the Invention

In the course of analyzing structural isomers of sc(Fv)2s, the present inventors discovered that there were differences in activity between the structural isomers. Furthermore, the inventors found that the ratio of structural isomers in sc(Fv)2 compositions was adjustable and specific structural isomers could be separately obtained from the sc(Fv)2 compositions. The present invention was achieved based on these findings.

The present invention provides methods for producing pharmaceutical compositions, which comprise steps of separating structural isomers in the sc(Fv)2 compositions and obtaining specific structural isomers from the separated structural isomers.

In the present invention, sc(Fv)2 are single-chain low molecular weight antibodies produced by linking four or more antibody variable regions with linkers and such. The sc(Fv)2 includes, for example, antibodies with the following arrangement: [variable region 1] (linker 1)[variable region 2] (linker 2)[variable region 3] (linker 3)[variable region 4].

Generally, sc(Fv)2 is a single-chain antibody produced by linking two VHs and two VLs, four variable regions in total, with linkers and such (Hudson *et al.*, J Immunol. Methods (1999))

231 : 177-189). The two VHs and two VLs may derive from different monoclonal antibodies.

sc(Fv)2s can be produced by methods known to those skilled in the art, for example, by linking scFvs with linkers. scFv contains the VH and VL of an antibody, and these regions exist on a single polypeptide chain (for a review on scFv, see Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, eds. Rosenberg and Moore, Springer Verlag, New York (1994) pp. 269-315).

The sc(Fv)2s of the present invention include antibodies in which two VHs and two VLs are arranged in the order of, VH, VL, VH, and VL ([VH] linker [VL] linker [VH] linker [VL]), starting from the N terminus of a single-chain polypeptide. However, the order of the two VHs and two VLs is not limited to the above arrangement, and may be arranged in any order.

Examples of arrangements are listed below:

[VL] linker [VH] linker [VH] linker [VL]

[VH] linker [VL] linker [VL] linker [VH]

[VH] linker [VH] linker [VL] linker [VL]

[VL] linker [VL] linker [VH] linker [VH]

[VL] linker [VH] linker [VL] linker [VH]

The sc(Fv)2s of the present invention may also comprise amino acid sequences in addition to those of the antibody variable regions and linkers.

The variable regions of the antibody used in the present invention may be the entire variable region, or partial sequences of the variable region, as long as they retain antigen-binding activity. Furthermore, the amino acid sequences in the variable regions may be substituted, deleted, added, inserted, and such. For example, the variable regions may be chimerized or humanized to reduce antigenicity.

Other proteins, such as an Fc domain of an IgG, may be fused with the N or C terminus of the sc(Fv)2 of the present invention (Clinical Cancer Research (2004) 10, 1274-1281). Such proteins to be fused can be suitably selected by those skilled in the art. The sc(Fv)2 of the present invention may be in the form of (scFv)2-Fc in which two units of scFv are linked to the N terminus of each hinge of Fc and the antibody Fc region is used as the middle linker (linker 2) (J Immunol Methods (2005) 306(1-2):93-103).

The sc(Fv)2s of the present invention may be conjugated with carrier polymers, such as PEGs, or organic compounds, such as anticancer agents. Alternatively, sugar chains can be added by inserting a glycosylation sequence.

The linkers for linking the variable regions of an antibody can be arbitrary peptide linkers that can be introduced by genetic engineering, or synthetic linkers (for example, see Protein Engineering (1996) 9(3), 299-305); however, peptide linkers are preferred in the present invention. The length of the peptide linkers can be suitably selected by those skilled in the art,

depending on the purpose, and is preferably five amino acids or more (the upper limit is not particularly limited; however, the length is typically 30 amino acids or less, preferably 20 amino acids or less), and more preferably 15 amino acids. When an sc(Fv)₂ comprises three peptide linkers, the lengths of the peptide linkers may all be the same or different.

5 For example, such peptide linkers include:

Ser

Gly-Ser

Gly-Gly-Ser

Ser-Gly-Gly

10 Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 9)

Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 10)

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 11)

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 12)

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 13)

15 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 14)

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 15)

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 16)

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 11))_n

(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 12))_n

20 where n is an integer of one or more. The lengths and sequences of the peptide linkers can be suitably selected by those skilled in the art, depending on the purpose.

Synthetic linkers (chemical crosslinking agents) include crosslinking agents routinely used to crosslink peptides, for example, N-hydroxy succinimide (NHS), disuccinimidyl suberate (DSS), bis(succinimidyl) suberate (BS3), dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP),
 25 dithiobis(succinimidyl propionate) (DTSSP), ethylene glycol bis(succinimidyl succinate) (EGS), ethylene glycol bis(sulfosuccinimidyl succinate) (sulfo-EGS), disuccinimidyl tartrate (DST), disulfosuccinimidyl tartrate (sulfo-DST), bis[2-(succinimidoxycarbonyloxy)ethyl] sulfone (BSOCOES), and bis[2-(succinimidoxycarbonyloxy)ethyl] sulfone (sulfo-BSOCOES). These crosslinking agents are commercially available.

30 In general, three linkers are required to link four antibody variable regions together. The linkers to be used may all be the same or different.

Herein, the sc(Fv)₂ compositions refer to compositions comprising one or more structural isomers of sc(Fv)₂.

sc(Fv)₂ compositions can be prepared by methods known to those skilled in the art.

35 For example, the sc(Fv)₂ compositions can be prepared by introducing into a host cell a vector comprising DNA encoding sc(Fv)₂ as an insert, expressing sc(Fv)₂, and collecting the

expression products.

The vectors are not particularly limited, and any vector can be used so long as it can stably carry the insert DNA. For example, when *Escherichia coli* (*E. coli*) is used as the host, various commercially available vectors may be used; however, preferred cloning vectors are pBluescript vector (Stratagene). When using vectors for the purpose of producing the sc(Fv)₂ of the present invention, expression vectors are particularly useful. The expression vectors are not particularly limited so long as the vectors expresses the sc(Fv)₂ *in vitro*, in *E. coli*, in culture cells, or in a body of an organism. For example, pBEST vector (Promega) is preferred for *in vitro* expression; pET vector (Invitrogen), for *E. coli*; pME18S-FL3 vector (GenBank Accession No. AB009864), for culture cells; and pME18S vector (Mol Cell Biol. 8:466-472 (1988)), for organisms. DNAs of the present invention can be inserted into the vectors by conventional methods, for example, by ligation using restriction sites (Current protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 11.4-11.11).

The host cells described above are not particularly limited, and depending on the purpose, various host cells can be used. Cells for expressing sc(Fv)₂ include, for example, bacterial cells (for example, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptomyces*, and *Bacillus subtilis*); fungal cells (for example, yeast and *Aspergillus*); insect cells (for example, *Drosophila* S2 and *Spodoptera* SF9); animal cells (for example, CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, and Bowes melanoma cell); and plant cells. The vectors can be introduced into host cells by known methods, for example, calcium-phosphate precipitation method, electroporation (Current protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 9.1-9.9), lipofectamine method (GIBCO-BRL), and microinjection method.

When the sc(Fv)₂ of the present invention is secreted into the culture media, the sc(Fv)₂ compositions can be collected by collecting the culture media. Alternatively, when the sc(Fv)₂ is produced within cells, the cells are first lysed and then the sc(Fv)₂ compositions are collected.

The sc(Fv)₂ compositions of the present invention may be in any state, so long as they comprise one or more structural isomers of sc(Fv)₂. The compositions include, for example, crude compositions such as recombinant cell cultures, and compositions in a purified state, but are not limited thereto.

In the present invention, structural isomers refer to proteins whose amino acid sequences are identical but the conformations (secondary or tertiary structures) are different from each other. In general, structural isomers are different in at least one of chemical, biological, or physical properties.

The structural isomers of sc(Fv)₂ include, for example, structural isomers of single chain diabody type and bivalent scFv type.

Herein, the single chain diabody type refers to sc(Fv)₂ having a structure in which

variable regions 1 and 4 are associated together, and variable regions 2 and 3 are associated together, when the sc(Fv)₂ are in the following arrangement: [variable region 1] (linker 1)[variable region 2] (linker 2)[variable region 3] (linker 3)[variable region 4].

Herein, the bivalent scFv type refers to sc(Fv)₂ having a structure in which variable regions 1 and 2 are associated together and variable regions 3 and 4 are associated together.

The single chain diabody type and bivalent scFv type include, for example, sc(Fv)₂ having the structure shown in Fig. 1b. Whether a structural isomer of sc(Fv)₂ has a single chain diabody type structure or bivalent scFv type structure can be determined by the methods for identifying structural isomers as described below. Alternatively, such an identification can be carried out by NMR analysis, crystal structure analysis, or such.

The structural isomers can be separated and obtained (purified) from sc(Fv)₂ compositions, for example, by loading the sc(Fv)₂ compositions onto an ion exchange or hydroxyapatite column and obtaining or removing specific structural isomers, but are not limited to these methods. The purification can also be carried out by methods known to those skilled in the art, such as various chromatographic columns, filtration, ultrafiltration, salting precipitation, solvent precipitation, solvent extraction, distillation, immunoprecipitation, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing, capillary isoelectric focusing, dialysis, and recrystallization.

Chromatographies include, for example, ion exchange chromatographies, adsorption chromatographies, isoelectric focusing, gel filtrations, reverse-phase chromatographies, and hydrophobic chromatographies (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Chromatographies can be carried out by using liquid phase chromatographies such as HPLC and FPLC.

When ion exchange chromatographies are used, the types of ion exchange columns to be used are not particularly limited. Both cation exchange columns and anion exchange columns may be used, and such columns can be suitably determined depending on the target antibody, structural isomer, or such. For example, SP ion exchange columns, Q ion exchange columns, and the like can be used, but are not limited thereto. Adsorption chromatographies include, for example, hydroxyapatite chromatography, but are not limited thereto.

Based on the present invention, purified samples of specific structural isomers can also be obtained using these purification methods.

The production methods of the pharmaceutical compositions of the present invention compares the activity between the structural isomers of sc(Fv)₂ and pre-determines the structural isomer with a higher activity, when the structural isomers in sc(Fv)₂ compositions are different in their activities. Thus they allow the separation and acquisition of a structural isomer with

higher activity from structural isomers in sc(Fv)₂ compositions. Furthermore, the production methods of the pharmaceutical compositions of the present invention enable the preparation of compositions of sc(Fv)₂ having predetermined linker lengths, in which the linker lengths are determined to obtain a preferred ratio of structural isomers in the sc(Fv)₂ compositions using the method described below, before separating the structural isomers from the sc(Fv)₂ compositions. Alternatively, sc(Fv)₂ compositions can also be prepared by the following steps: preparing multiple sc(Fv)₂ compositions with varying linker lengths before separating the structural isomers from the sc(Fv)₂ compositions; analyzing the ratio of the structural isomers by the methods of analyzing the ratio of structural isomers described below; selecting sc(Fv)₂ having linkers that give a preferred ratio of structural isomers in sc(Fv)₂ compositions, and preparing sc(Fv)₂ compositions from the selected sc(Fv)₂. Alternatively, sc(Fv)₂ compositions can also be prepared from the selected sc(Fv)₂ by modifying amino acid residues which form the contact surface of VH and VL, using the method described below.

Herein, the structural isomer with higher activity refers to structural isomers which have a high activity, preferably having the highest activity, when the structural isomers differ in their activities. For example, when two types of structural isomers exist, the structural isomer having higher activity is the present invention's structural isomer with higher activity.

Structural isomers with higher activity can be determined by methods known to those skilled in the art. The structural isomers with higher activity can be determined, for example, by isolating each structural isomer and by measuring their activities of interest under the same conditions.

The activity of the present invention may be any activity, such as binding activity, neutralizing activity, cytotoxic activity, agonistic activity, antagonistic activity, and enzymatic activity. The activity is not particularly limited; however, the activity is preferably an activity that quantitatively and/or qualitatively alters or influences living bodies, tissues, cells, proteins, DNAs, RNAs, and such., Agonistic activities are especially preferred.

"Agonistic activity" refers to an activity that induces a change in some physiological activity by transducing a signal into cells and such, due to the binding of an antibody to an antigen such as a receptor. Physiological activities include, but are not limited to, for example, proliferation activity, survival activity, differentiation activity, transcriptional activity, membrane transportation activity, binding activity, proteolytic activity, phosphorylation/dephosphorylation activity, oxidation/reduction activity, transfer activity, nucleolytic activity, dehydration activity, cell death-inducing activity, and apoptosis-inducing activity.

The antigens of the present invention are not particularly limited, and any antigen may be used. Examples of antigens include, receptors, tumor antigens, MHC antigens, and differentiation antigens. Examples of receptors include receptors belonging to receptor families

such as the hematopoietic growth factor receptor family, the cytokine receptor family, the tyrosine kinase receptor family, the serine/threonine kinase receptor family, the TNF receptor family, the G protein-coupled receptor family, the GPI-anchored receptor family, the tyrosine phosphatase receptor family, the adhesion factor family, and the hormone receptor family.

- 5 There are many documents that describe receptors belonging to these receptor families, and their characteristics, which include for example, Cooke BA, King RJB, van der Molen HJ Eds. New Comprehensive Biochemistry Vol.18B "Hormones and their Actions Part II" pp. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV, New York, USA; Patthy L. (1990) *Cell*, 61: 13-14; Ullrich A. *et al.* (1990) *Cell*, 61: 203-212; Massagui J. (1992) *Cell*, 69: 1067-1070; Miyajima A. *et al.* (1992) *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 295-331; Taga T. and Kishimoto T. (1992) *FASEB J.*, 7: 3387-3396; Fantl WI. *et al.* (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453-481; Smith CA., *et al.* (1994) *Cell*, 76: 959-962; Flower DR. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1422: 207-234; SAIBO KOGAKU (Cell Technology) Supplementary vol. Handbook series "Handbook for Adhesion factors" M. Miyasaka Ed. (1994) Shujunsha, Tokyo, Japan, and so on.
- 15 Specific receptors belonging to the receptor families listed above include: human or mouse erythropoietin (EPO) receptor, human or mouse granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) receptor, human or mouse thrombopoietin (TPO) receptor, human or mouse insulin receptor, human or mouse Flt-3 ligand receptor, human or mouse platelet-derived growth factor (PDGF) receptor, human or mouse interferon (IFN)- α and - β receptor, human or mouse leptin
- 20 receptor, human or mouse growth hormone (GH) receptor, human or mouse interleukin (IL)-10 receptor, human or mouse insulin-like growth factor (IGF)-I receptor, human or mouse leukemia inhibitory factor (LIF) receptor, and human or mouse ciliary neurotrophic factor (CNTF) receptor (hEPOR: Simon, S. *et al.* (1990) *Blood* 76, 31-35; mEPOR: D'Andrea, AD. *et al.* (1989) *Cell* 57, 277-285; hG-CSFR: Fukunaga, R. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 8702-8706; mG-CSFR: Fukunaga, R. *et al.* (1990) *Cell* 61, 341-350; hTPOR: Vigon, I. *et al.* (1992) 89, 5640-5644; mTPOR: Skoda, RC. *et al.* (1993) 12, 2645-2653; hInsR: Ullrich, A. *et al.* (1985) *Nature* 313, 756-761; hFlt-3: Small, D. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91, 459-463; hPDGFR: Gronwald, RGK. *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85, 3435-3439; hIFN α/β R: Uze, G. *et al.* (1990) *Cell* 60, 225-234, and Novick, D. *et al.* (1994) *Cell* 77, 391-400).
- 30

Tumor antigens, which are also called tumor-specific antigens, are expressed along with malignant transformation of cells. Furthermore, abnormal sugar chains displayed on cellular surface or protein molecules upon canceration of cells also serve as tumor antigens, and are called tumor-associated carbohydrate antigens in particular. Tumor antigens include, for

- 35 example, CA19-9, CA15-3, sialyl SSEA-1 (SLX) and the like.

MHC antigens are broadly grouped under MHC class I and II antigens. MHC class I

antigens include HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, and -H, while MHC class II antigens include HLA-DR, -DQ, and -DP.

Differentiation antigens include CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15s, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33, CD34, CD35, CD38, CD40, CD41a, CD41b, CD42a, CD42b, CD43, CD44, CD45, CD45RO, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD51, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD64, CD69, CD71, CD73, CD95, CD102, CD106, CD122, CD126, and CDw130 and such.

There is no limitation as to the type of detection indicators to be used for determining the change in activity, as long as the indicator can monitor quantitative and/or qualitative changes. For example, it is possible to use cell-free assay indicators, cell-based assay indicators, tissue-based assay indicators, and in biological indicators.

Indicators that can be used in cell-free assays include enzymatic reactions, quantitative and/or qualitative changes in proteins, DNAs, or RNAs. Such enzymatic reactions include, for example, amino acid transfers, sugar transfers, dehydrations, dehydrogenations, and substrate cleavages. Alternatively, protein phosphorylations, dephosphorylations, dimerizations, multimerizations, hydrolyses, dissociations and such; DNA or RNA amplifications, cleavages, and extensions can be used as the indicator in cell-free assays. For example, protein phosphorylations downstream of a signal transduction pathway may be used as a detection indicator.

Alterations in cell phenotype, for example, quantitative and/or qualitative alterations in products, alterations in growth activity, alterations in cell number, morphological alterations, or alterations in cellular properties, can be used as indicators in cell-based assays. The products include, for example, secretory proteins, surface antigens, intracellular proteins, and mRNAs. The morphological alterations include, for example, alterations in dendrite formation and/or dendrite number, alteration in cell flatness, alteration in cell elongation/axial ratio, alterations in cell size, alterations in intracellular structure, heterogeneity/homogeneity of cell populations, and alterations in cell density. Such morphological alterations can be observed under a microscope. Cellular properties to be used as the indicator include anchor dependency, cytokine-dependent response, hormone dependency, drug resistance, cell motility, cell migration activity, pulsatory activity, and alteration in intracellular substances. Cell motility includes cell infiltration activity and cell migration activity. The alterations in intracellular substances include, for example, alterations in enzyme activity, mRNA levels, levels of intracellular signaling molecules such as Ca^{2+} and cAMP, and intracellular protein levels. When a cell membrane receptor is used, alterations in the cell proliferating activity induced by receptor stimulation can be used as the indicator.

Indicators to be used in tissue-based assays include functional alterations adequate for the subject tissue.

Alterations in tissue weight, alterations in the blood system (for example, alterations in blood cell counts, protein contents, or enzyme activities), alterations in electrolyte levels, and alterations in the circulating system (for example, alterations in blood pressure or heart rate) can be used as biological indicators.

The methods for measuring such detection indices are not particularly limited. For example, absorbance, luminescence, color development, fluorescence, radioactivity, fluorescence polarization, surface plasmon resonance signal, time-resolved fluorescence, mass, absorption spectrum, light scattering, and fluorescence resonance energy transfer may be used. These measurement methods are known to those skilled in the art and may be selected appropriately depending on the purpose.

For example, absorption spectra can be obtained by using a conventional photometer, plate reader, or such; luminescence can be measured with a luminometer or such; and fluorescence can be measured with a fluorometer or such. Mass can be determined with a mass spectrometer. Radioactivity can be determined with a device such as a gamma counter depending on the type of radiation. Fluorescence polarization can be measured with BEACON (TaKaRa). Surface plasmon resonance signals can be obtained with BIACORE. Time-resolved fluorescence, fluorescence resonance energy transfer, or such can be measured with ARVO or such. Furthermore, a flow cytometer can also be used for measuring. It is possible to use one of the above methods to measure two or more different types of detection indices. A greater number of detection indices may also be examined by using two or more measurement methods simultaneously and/or consecutively. For example, fluorescence and fluorescence resonance energy transfer can be measured at the same time with a fluorometer.

In the present invention, agonistic activities can be assayed by methods known to those skilled in the art. For example, agonistic activities can be determined by methods using cell growth as an indicator, as described in the Examples. More specifically, an antibody whose agonistic activity is to be determined is added to cells which proliferate in an agonist-dependent manner, followed by incubation of the cells. Then, a reagent such as WST-8 which shows a coloring reaction at specific wavelengths depending on the viable cell count, is added to the culture and the absorbance is measured. Subsequently, the agonistic activity can be determined using the obtained absorbance as an indicator.

Cells that proliferate in an agonist-dependent manner can also be prepared by methods known to those skilled in the art. For example, when the antigen is a receptor capable of transducing cell growth signals, cells expressing the receptor may be used. Alternatively, when the antigen is a receptor that cannot transduce signals, a chimeric receptor consisting of the

intracellular domain of a receptor that transduces cell growth signals and the extracellular domain of a receptor that does not transduce cell growth signals can be prepared for cellular expression. Receptors that transduce cell growth signals include, for example, G-CSF receptors, mpl, neu, GM-CSF receptors, EPO receptors, c-kit, and FLT-3. Cells that can be used to express a receptor include, for example, BaF3, NFS60, FDCP-1, FDCP-2, CTLL-2, DA-1, and KT-3.

Herein, pharmaceutical sc(Fv)2 compositions refer to sc(Fv)2 compositions aimed at administration to humans for treating or preventing diseases.

Specific structural isomers of sc(Fv)2 separated and obtained by the methods of the present invention or sc(Fv)2 compositions with an increased portion of specific structural isomers as described in the methods below can be mixed with pharmaceutically acceptable carriers or solvents that are inactive to the sc(Fv)2 to prepare pharmaceutical compositions. Specifically, the present invention also provides pharmaceutical compositions that comprise as an active ingredient a structural isomer of sc(Fv)2 separated and obtained by the methods described above or a sc(Fv)2 composition with an increased portion of a specific structural isomer.

Such pharmaceutically acceptable carriers and solvents include, for example, sterilized water, physiological saline, stabilizers, vehicles, antioxidants (ascorbic acid and such), buffers (phosphate, citrate, and other organic acids and such), preservatives, detergents (PEG and Tween and the like), chelating agents (EDTA and the like), and binders and the like. Alternatively, the pharmaceutically acceptable carries and solvents may comprise other low molecular weight antibody polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, and immunoglobulins; amino acids, such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, and lysine; carbohydrates and sugars, such as polysaccharides and monosaccharides; and sugar alcohols, such as mannitol and sorbitol. When prepared as aqueous solutions for injection, the compositions can comprise, for example, physiological saline, an isotonic solution comprising glucose and other adjuvants, including, for example, D-sorbitol, D-mannose, D-mannitol, and sodium chloride, which can also be used in combination with an appropriate solubilizing agent, for example, alcohol (such as ethanol), polyalcohol (propylene glycol and PEG and such), and non-ionic detergent (polysorbate 80 and HCO-50 and such).

If required, the agents may be encapsulated in microcapsules (microcapsules of hydroxymethylcellulose, gelatin, poly[methylmethacrylic acid] or such) or prepared as colloidal drug delivery systems (liposome, albumin microspheres, microemulsion, nano-particles, nano-capsules, and such) (see "Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed., 1980, and the like). Furthermore, methods for making agents into sustained-release agents are also known, and are applicable to the present invention (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res.

1981, 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98-105; U.S. Patent No. 3,773,919; European Patent Application No. (EP) 58,481; Sidman *et al.*, Biopolymers 1983, 22: 547-556; and EP 133,988).

The sc(Fv)₂ pharmaceutical compositions of the present invention can be prepared by methods known to those skilled in the art and are not limited to the methods described above.

Administration to patients may be performed either orally or parenterally, but preferably is performed parenterally. Specific examples include injections, nasal formulations, pulmonary formulations, and cutaneous formulations. For example, injections can be administered systemically or locally by intravenous injection, intramuscular injection, intraperitoneal injection, or subcutaneous injection. Furthermore, methods for administration can be suitably selected according to the age and symptoms of the patient. Dose to be given for example, can be selected from within the range of 0.0001 mg to 1,000 mg per kg of body weight for a single dose. Alternatively, the dose can be selected from within the range of 0.001 to 100,000 mg/body for each patient. However, the dose of an antibody of the present invention is not limited to these examples.

The present invention provides sc(Fv)₂ compositions in which the content ratio of a specific structural isomer is 80% or greater, preferably 90% or greater, and more preferably 95% or greater. More specifically, sc(Fv)₂ compositions in which the content ratio of single chain diabody type is 80% or greater, preferably 90% or greater, and more preferably 95% or greater, or sc(Fv)₂ compositions in which the content ratio of bivalent scFv type is 80% or greater, preferably 90% or greater, and more preferably 95% or greater can be exemplified.

Herein, "the content ratio of a specific structural isomer is 80%" means that the proportion of a specific structural isomer to the total structural isomers in the sc(Fv)₂ composition is 80%. For example, when an sc(Fv)₂ composition comprises two types of structural isomers, single chain diabody type and bivalent scFv type, "the content ratio of the single chain diabody type is 80%" means that the ratio of the single chain diabody type and bivalent scFv type is 80:20.

In the present invention, the upper limit of the content ratio of 80% or greater, 90% or greater, or 95% or greater is not particularly limited; however, the limit is preferably 100% or close to 100%. The upper limit that is close to 100% includes, for example, 99.999%, 99.99%, 99.9%, 99%, or such, varying depending on the purification and/or analytical techniques of those skilled in the art. The content ratio of a structural isomer can be determined, for example, by separating the structural isomers using ion exchange chromatography, isoelectric focusing, capillary isoelectric focusing, and the like.

The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising as an active ingredient an sc(Fv)₂ composition in which the content ratio of a specific structural

isomer is 80% or greater. When sc(Fv)2 is used as a pharmaceutical composition, in general, higher activities are preferred. Thus, the composition preferably comprises as an active ingredient an sc(Fv)2 composition in which the content ratio of a structural isomer with higher activity is 80% or greater. For example, the agonistic activity of an anti-Mpl antibody is higher when the antibody is in the form of a single chain diabody. Therefore, when sc(Fv)2 is used against Mpl as an agonist, such pharmaceutical compositions preferably comprises as an active ingredient an sc(Fv)2 composition in which the content ratio of single chain diabody type is 80% or greater.

The present invention provides methods for controlling the activity of sc(Fv)2 compositions, which comprise the steps of modifying the proportion of structural isomers in the sc(Fv)2 compositions.

Based on the finding that there are significant differences between the activities of structural isomers of sc(Fv)2, the present invention has discovered that the activity of sc(Fv)2 compositions can be controlled by altering the content ratio of a specific structural isomer in the sc(Fv)2 compositions. Specific methods for controlling the activity of sc(Fv)2 compositions include, for example, altering the ratio between the single chain diabody type and bivalent scFv type in the sc(Fv)2 compositions. The activity of sc(Fv)2 compositions can thus be controlled by this method.

The present invention also provides methods for increasing the activity of sc(Fv)2 compositions, which comprise increasing the proportion of a specific structural isomer in the sc(Fv)2 compositions. This can be performed by the above-described methods for separating and obtaining specific structural isomers from the sc(Fv)2 compositions.

For example, highly active sc(Fv)2 compositions can be produced by increasing the proportion of a structural isomer with higher activity in sc(Fv)2 compositions. In contrast, sc(Fv)2 compositions with a repressed activity can be produced by reducing the proportion of the structural isomer with higher activity in the sc(Fv)2 compositions.

When the activity of the single chain diabody type is higher than that of the bivalent scFv type, the activity of sc(Fv)2 compositions can be increased by increasing the content ratio of the single chain diabody type in sc(Fv)2 compositions, or the activity of sc(Fv)2 compositions can be reduced by increasing the content ratio of the bivalent scFv type. In contrast, when the activity of the bivalent scFv type is higher than that of the single chain diabody type, the activity of sc(Fv)2 compositions can be increased by increasing the content ratio of the bivalent scFv type in sc(Fv)2 compositions, or the activity of sc(Fv)2 compositions can be reduced by increasing the content ratio of the single chain diabody type. Whether the single chain diabody has the higher activity or whether the bivalent scFv has the higher activity depends on the type of activity of interest; however, the activity can be readily determined by methods known to those

skilled in the art.

When sc(Fv)2s are used as pharmaceutical compositions, higher activities are often more preferred in general. Accordingly, the activity of pharmaceutical compositions can be increased by altering the content of a specific structural isomer in sc(Fv)2 compositions.

The method for increasing the activity of sc(Fv)2 compositions by increasing the content ratio of a specific structural isomer contained in the sc(Fv)2 compositions can be any method. For example, the content ratio of a specific structural isomer may be increased after obtaining the sc(Fv)2 composition or alternatively, DNA encoding sc(Fv)2 may be designed so that the content ratio of a specific structural isomer would be increased.

Specific methods for increasing the proportion of a specific structural isomer after obtaining sc(Fv)2 compositions include, for example, methods that isolate the target structural isomer from the obtained sc(Fv)2 compositions (or removing structural isomers other than the target structural isomer). Such an isolation of the target structural isomers can be performed by the above-described protein separation and acquisition methods known to those skilled in the art.

Furthermore, the content ratio of a specific structural isomer can also be increased, for example, by heating sc(Fv)2 compositions. The present inventors discovered that the content ratio of the single chain diabody type could be increased by incubating sc(Fv)2 compositions at a constant temperature. Thus, the content ratio of the single chain diabody type can be increased by incubating sc(Fv)2 compositions at 15 to 50°C, preferably at 20 to 40°C, more preferably at 25 to 35°C. The increased content ratio of the single chain diabody type would be maintained even when the incubated sc(Fv)2 compositions are returned to the original temperature.

Methods for designing DNA encoding sc(Fv)2 to increase the content ratio of a specific structural isomer include, for example, the above described methods for designing DNA such that the linker is of appropriate length.

Furthermore, the content ratio of a specific structural isomer in sc(Fv)2 compositions can be increased by controlling the association of the variable regions of sc(Fv)2. Specifically, DNA encoding sc(Fv)2 is modified so that amino acid residues which form the contact surface of the sc(Fv)2 variable regions are modified.

Herein, "association" may in other words refer to the state of interaction between the variable regions of the sc(Fv)2, for example.

Herein, "controlling the association" means controlling to achieve a desired state of association, more specifically controlling to prevent an unfavorable association formed in the sc(Fv)2.

Herein, "contact surface" generally refers to the association surface when the association (interaction) takes place. Amino acid residues that form the contact surface generally refer to one or more amino acid residues in the variable regions of sc(Fv)2, which

participate in the association, and more preferably refer to amino acid residues that come close together and are involved in the interaction when association takes place. Specifically, such interactions include hydrogen bonding, electrostatic interaction, and salt bridging of amino acid residues that come close together upon association.

5 Herein, the “amino acid residues that form the contact surface” specifically describes the amino acid residues in the variable regions of sc(Fv)₂ that constitute the contact surface.

Specifically, the “modification” of amino acid residues in the methods of the present invention refers to substituting the original amino acid residues (before modification) with other amino acid residues, deleting the original amino acid residues, or newly adding some amino acid
10 residues, but preferably refers to substituting other amino acid residues for the original amino acid residues.

“Modifying the DNA” in the above-described methods of the present invention means to modify a DNA so that it corresponds to the amino acid residues to be introduced by the “modification” of the present invention. More specifically, “Modifying the DNA” means that a
15 DNA encoding the original amino acid residues is modified to a DNA encoding the amino acid residues with a modification introduced. This generally implies inserting, deleting, or substituting at least one nucleotide of the original DNA by gene manipulation or mutagenesis, to create a codon that encodes the target amino acid residue. Specifically, the codon encoding the original amino acid residue is replaced with a codon encoding an amino acid residue introduced
20 by modification. Such a DNA modification can be suitably carried out by techniques known to those skilled in the art, for example, the site-directed mutagenesis method, or PCR mutagenesis method.

In a preferred embodiment of the present invention, for example, mutations are introduced at amino acid residues on the contact surface so that the charges of two or more
25 amino acid residues forming the contact surface in the variable regions of sc(Fv)₂ are of the same kind. As a result of such modification of two or more amino acid residues involved in the association on the contact surface to have the same kind of charge, the association of the amino acid residues are inhibited by the repulsive force between the charges. Thus, such amino acid residues to be modified by the methods described above are preferably two or more amino acid
30 residues that come close to each other upon association of the variable regions of sc(Fv)₂ to form the contact surface.

The amino acid residues that come close together upon association can be found, for example, by analyzing the tertiary structure of sc(Fv)₂ and examining the amino acid sequences of the variable regions that form the contact surface upon association of the sc(Fv)₂. Such
35 amino acid residues that come close together at the contact surface are preferred targets for “modification” by the methods of the present invention.

Some amino acids are known to be charged. Generally known amino acids with a positive charge (positively-charged amino acids) include lysine (K), arginine (R), and histidine (H). Known amino acids with a negative charge (negatively charged amino acids) include aspartic acid (D) and glutamic acid (E) and such. Thus, in the present invention, “amino acid residues with the same kind of charge” preferably means amino acid residues with a positive charge, or those with a negative charge.

In the present invention, amino acid residues that form the contact surface are preferably modified to have the same kind of charge. Identical amino acids are more preferred among amino acid residues with the same kind of charge. For example, amino acid residues after modification may be lysine and arginine, more preferably the residues are two lysines or two arginines.

When multiple amino acid residues are introduced by modification, the amino acid residues may include a few non-charged amino acid residues.

There is no limitation as to the number of amino acid residues to be modified by the methods of the present invention. However, to avoid the reduction of binding activity to the antigen, preferably the number of amino acid residues modified is as few as possible. The above-mentioned “few” means, for example, about 1 to 10, preferably about 1 to 5, more preferably about 1 to 3, and still more preferably 1 or 2.

In a preferred embodiment of the present invention, when an amino acid residue (X) that forms the contact surface in the original sc(Fv)₂ is already a charged amino acid, or forms a hydrogen bond, an amino acid residue that comes close to amino acid residue (X) at association, and which corresponds to the amino acid residue (X) at association, is modified to an amino acid residue identical to amino acid residue (X) (or an amino acid residue with the same kind of charge as that of amino acid residue (X)). In this embodiment, one of the amino acid residues that form the contact surface may be modified.

In another preferred embodiment of the present invention, mutations are introduced at amino acid residues on the contact surface so that the modification of amino acid residues forming the contact surface of the variable regions in sc(Fv)₂ allows the amino acid residues forming the hydrophobic core on the contact surface to become charged amino acid residues.

In general, “hydrophobic core” refers to a part formed as a result of hydrophobic amino acid side chains assembling to the inner side of associated polypeptides. Hydrophobic amino acids include, for example, alanine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, tryptophan, and valine and such. In addition, amino acid residues other than the hydrophobic amino acid residues (for example, tyrosine) may be involved in the formation of the hydrophobic core. Together with the hydrophilic surface in which side chains of hydrophilic amino acids are exposed outside, the hydrophobic core can be a driving force to promote association of

water-soluble polypeptides. When hydrophobic amino acids of two different domains are at the molecule surface and are exposed to water molecules, the entropy is increased, resulting in increase of free energy. Accordingly, the two domains associate with each other to decrease the free energy for stabilization, and thus hydrophobic amino acids on the contact surface are buried inside the molecule, forming the hydrophobic core.

When amino acid residues forming the hydrophobic core which was formed by the association of polypeptides are modified to charged polar amino acids, the hydrophobic core formation would be inhibited, resulting in the inhibition of the polypeptide association. Similarly in sc(Fv)₂, which is a polypeptide, the hydrophobic core is formed upon association of the variable regions. Thus, the association of the variable regions can be controlled by replacing these amino acid residues in the hydrophobic core with charged amino acids.

By analyzing the desired sc(Fv)₂ amino acid sequence, those skilled in the art can find out whether a hydrophobic core exists, where the core is formed (regions), and so on.

Furthermore, knobs-into-holes technology can be used (Japanese Patent Kohyo Publication No. (JP-A) 2001-523971 (unexamined Japanese national phase publication corresponding to a non-Japanese international publication)) to promote a desirable association of amino acid residues that form the contact surface of the variable regions. The knobs-into-holes method is a method applicable to the present invention for introducing a specific and complementary interaction between the contact surfaces of the first and second polypeptides, which promotes heteromultimer formation and suppresses homomultimer formation (for example, introducing a residue containing a free thiol into both the first and second polypeptides at positions corresponding to the contact surfaces, so that a non-natural disulfide bond is formed between the first and second polypeptides). Knobs-into-holes is an already known technique to those skilled in the art. Those skilled in the art can suitably apply such a method to sc(Fv)₂s.

In addition, the above-described methods can also be used in combination.

In general, three CDRs and four FR regions constitute the variable region. In a preferred embodiment of the present invention, amino acid residues to be "modified" can be suitably selected, for example, from amino acid residues in the CDRs or FR region. In general, modification of amino acid residues in the CDRs may sometimes result in reduction of the binding activity to antigens. Thus, although such amino acid residues to be "modified" are not particularly limited, it is preferable that they be suitably selected from the amino acid residues in the FR region.

With respect to the desired sc(Fv)₂ the association of which is to be controlled by the methods of the present invention, those skilled in the art can suitably know the types of amino acid residues that come close together on the contact surface of FR upon association.

Such amino acid residues that come close together on the contact surface of FR upon

association include, for example, glutamine (Q) at position 39 (FR2 region) in VH and glutamine (Q) at position 38 (FR2 region) in VL facing (contacting) each other. Another preferred example include leucine (L) at position 45 (FR2) in VH and proline (P) at position 44 (FR2) in VL facing (contacting) each other. The numbering for these sites is based on the methods of

5 Kabat *et al.* (Kabat EA *et al.* 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH).

These amino acid residues are known to be highly conserved between human and mouse (J. Mol. Recognit. (2003) 16: 113-120). Thus, the association of variable regions of sc(Fv)2s other than the ones described in the Examples can also be controlled by modifying the amino acid residues corresponding to the amino acid residues listed above.

10 Example of methods for increasing the content ratio of the single chain diabody type in an sc(Fv)2 having the arrangement of [variable region 1] (linker 1)[variable region 2] (linker 2)[variable region 3] (linker 3)[variable region 4] are described below.

When bivalent scFv type occurs in the sc(Fv)2, substitution mutations are introduced at the amino acid residues which form the contact surfaces of the variable regions to suppress the
15 association between variable regions 1 and 2, and between variable regions 3 and 4, but not to suppress (to enhance) the association between variable regions 1 and 4, and between variable region 2 and 3.

When structural isomers having a structure where variable regions 1 and 3 are associated and variable regions 2 and 4 are associated occur in the sc(Fv)2, substitution
20 mutations are introduced at the amino acid residues that form the contact surfaces of the variable regions to suppress the association described above but not to suppress (to enhance) the association between variable regions 1 and 4, and the association between variable regions 2 and 3.

When structural isomers having a structure where variable regions 1 and 3 are
25 associated occur in the sc(Fv)2, substitution mutations are introduced at the amino acid residues that form the contact surfaces of the variable regions to suppress the association described above but not to suppress (to enhance) the association between variable regions 1 and 4, and between variable regions 2 and 3.

When structural isomers having a structure where variable regions 2 and 4 are
30 associated occur in the sc(Fv)2, substitution mutations are introduced at the amino acid residues that form the contact surfaces of the variable regions to suppress the association described above but not to suppress (to enhance) the association between variable regions 1 and 4, and between variable regions 2 and 3.

Alternatively, examples of methods for increasing the content ratio of the bivalent scFv
35 type is described below in an sc(Fv)2 having the arrangement of [variable region 1] (linker 1)[variable region 2] (linker 2)[variable region 3] (linker 3)[variable region 4],.

When the single chain diabody type occurs in the sc(Fv)₂, substitution mutations are introduced at the amino acid residues that form the contact surfaces of the variable regions to suppress association between variable regions 1 and 4, and between variable regions 2 and 3, but not to suppress (to enhance) the association between variable regions 1 and 2, and between variable region 3 and 4.

When structural isomers having a structure where variable regions 1 and 3 are associated and variable regions 2 and 4 are associated occur in the sc(Fv)₂, substitution mutations are introduced at the amino acid residues that form the contact surfaces of the variable regions to suppress the association described above but not to suppress (to enhance) the association between variable regions 1 and 2, and the association between variable regions 3 and 4.

When structural isomers having a structure where variable regions 1 and 3 are associated occur in the sc(Fv)₂, substitution mutations are introduced at the amino acid residues that form the contact surfaces of the variable regions to suppress the association described above but not to suppress (to enhance) the association between variable regions 1 and 2, and between variable regions 3 and 4.

When structural isomers having a structure where variable regions 2 and 4 are associated occur in the sc(Fv)₂ form, substitution mutations are introduced at the amino acid residues that form the contact surfaces of the variable regions to suppress the association described above but not to suppress (to enhance) the association between variable regions 1 and 2, and between variable regions 3 and 4.

More specific examples are described below, but are not limited thereto.

For example, for decreasing the percentage of the bivalent scFv type and increasing the percentage of the single chain diabody type in an sc(Fv)₂ having the arrangement of [VH1] linker [VL2] linker [VH3] linker [VL4], for example, amino acid residues that form the contact surfaces of VH1 and VL2 are substituted with amino acid residues having the same kind of charge. Furthermore, amino acid residues that form the contact surfaces of VH3 and VL4 are substituted with amino acid residues having the same kind of charge, which are not repulsive to (preferably having affinity to) the amino acid residues introduced into VH1 and VL2.

Alternatively, for example, the amino acid side chains forming the contact surface of VH1 and VL2 are substituted with larger side chains (knobs), and amino acid side chains forming the contact surface of VH3 and VL4 are substituted with smaller side chains (holes). Such a substitution allows a regulation such that the association between VH1 and VL2, and between VH3 and VL4 is suppressed, but the association between VH1 and VL4, and between VL2 and VH3 is not suppressed (enhanced).

Alternatively, when decreasing the percentage of the single chain diabody type and

increasing the percentage of the bivalent scFv type in sc(Fv)₂ having the arrangement of: [VH1]
linker [VL2] linker [VH3] linker [VL4], for example, amino acid residues that form the contact
surface of VH1 and VL4 are substituted with amino acid residues having the same kind of charge.
Furthermore, amino acid residues that form the contact surface of VH3 and VL2 are substituted
5 with amino acid residues with the same kind of charge, which are not repulsive to (preferably
having affinity to) the amino acid residues introduced into VH1 and VL4. Moreover, for
example, amino acid side chains that form the contact surface of VH1 and VL4 are substituted
with larger side chains (knob), and amino acid side chains that form the contact surface of VH3
and VL2 are substituted with smaller side chains (hole). Such a substitution allows a regulation
10 such that the association between VH1 and VL4 is suppressed, but the association between VH1
and VL2, and between VH3 and VL4 is not suppressed (enhanced).

In a preferred embodiment of the present invention, the present invention provides
methods for increasing the content ratio of specific structural isomers in sc(Fv)₂ compositions,
which comprise the step of substituting the following amino acids residues (1) and (2), or (3) and
15 (4) with amino acid residues of the same kind of charge.

(1) an amino acid residue in the VH of sc(Fv)₂, which corresponds to the amino acid residue at
position 39 in the heavy chain amino acid sequence

(2) an amino acid residue in the VL of sc(Fv)₂, which corresponds to the amino acid residue at
position 38 in the heavy chain amino acid sequence

20 (3) an amino acid residue in the VH of sc(Fv)₂, which corresponds to the amino acid residue at
position 45 in the heavy chain amino acid sequence

(4) an amino acid residue in the VL of sc(Fv)₂, which corresponds to the amino acid residue at
position 44 in the heavy chain amino acid sequence

The present invention also provides methods for increasing the content ratio of specific
25 structural isomers in sc(Fv)₂ compositions, which comprise the step of substituting a charged
amino acid residue for an amino acid residue of either (1) or (2), or either (3) or (4).

(1) an amino acid residue in the VH of sc(Fv)₂, which corresponds to the amino acid residue at
position 39 in the heavy chain amino acid sequence

(2) an amino acid residue in the VL of sc(Fv)₂, which corresponds to the amino acid residue at
30 position 38 in the heavy chain amino acid sequence

(3) an amino acid residue in the VH of sc(Fv)₂, which corresponds to the amino acid residue at
position 45 in the heavy chain amino acid sequence

(4) an amino acid residue in the VL of sc(Fv)₂, which corresponds to the amino acid residue at
position 44 in the heavy chain amino acid sequence

35 In human and mouse, the amino acid residues of (1) to (4) above are in general: (1)
glutamine (Q), (2) glutamine (Q), (3) leucine (L), and (4) proline (P), respectively, but are not

limited thereto. Other amino acids equivalent to these may be used. For example, an amino acid corresponding to the amino acid residue at position 38 in the amino acid sequence of VL may be, for example, histidine (H) in human. Those skilled in the art can know the type of amino acid residue that corresponds to an amino acid residue at an arbitrary position by referring to previously published documents and such (for example, J. Mol. Recognit. (2003) 16: 113-120).

The isomerization of the structural isomers in sc(Fv)₂ compositions, which is described below, can also be suppressed by substituting amino acid residues that form the contact surface of the heavy chain and light chain variable regions of sc(Fv)₂ with charged amino acid residues.

The present invention also provides methods for suppressing the isomerization of the structural isomers in sc(Fv)₂ compositions, which comprise the step of substituting amino acid residues that form the contact surface of heavy chain and light chain variable regions of sc(Fv)₂ with charged amino acid residues. A specific embodiment of the step of substituting amino acid residues that form the contact surface of heavy chain and light chain variable regions of sc(Fv)₂ with charged amino acid residues is described above.

The present invention provides methods for controlling the ratio of structural isomers in sc(Fv)₂ compositions by adjusting the lengths of two end linkers and/or middle linker of sc(Fv)₂. In the present invention, the two end linkers are linkers 1 and 3, and the middle linker is linker 2, when sc(Fv)₂ has the arrangement of [variable region 1] (linker 1)[variable region 2] (linker 2)[variable region 3] (linker 3)[variable region 4].

Specifically, the ratio of the single chain diabody type in sc(Fv)₂ compositions can be increased by adjusting the length of two end linkers to 0 to 12 amino acids and the length of middle linker to 10 to 30 amino acids. Alternatively, the ratio of the bivalent scFv type in sc(Fv)₂ compositions can be increased by adjusting the length of two end linkers to 12 to 30 amino acids and the length of middle linker to 0 to 10 amino acids.

Furthermore, the present invention provides methods for producing sc(Fv)₂ compositions in which the content ratio of the single chain diabody type is 80% or higher, preferably 90% or higher, and more preferably 95% or higher by adjusting the lengths of the two end linkers and/or the middle linker. Furthermore, the present invention provides methods for producing sc(Fv)₂ compositions in which the content ratio of the bivalent scFv type is 80% or higher, preferably 90% or higher, and more preferably 95% or higher by adjusting the lengths of the two end linkers and/or the middle linker.

Specifically, sc(Fv)₂ compositions in which the content ratio of the single chain diabody type is 80% or higher can be produced by adjusting the length of two end linkers to 0 to 12 amino acids, and the length of middle linker to 0 to 10 amino acids. Alternatively, sc(Fv)₂ compositions in which the content ratio of the bivalent scFv type is 80% or higher can be

produced by adjusting the length of two end linkers to 12 to 30 amino acids and the length of middle linker to 0 to 10 amino acids.

The present invention also provides methods for identifying the structures of structural isomers in sc(Fv)₂ compositions, which comprise the step of cleaving the linker portions of sc(Fv)₂.

Herein, the linker portion refers to a portion comprising a linker and its adjacent region. The adjacent linker region refers to a region consisting of 20 amino acids from the amino acid next to the linker up to the 20th amino acid towards the variable region side. Thus, the linker portion is a portion in which a region consisting of 20 amino acids is linked to each end of a linker.

This method is relatively convenient than methods for analyzing single chain diabody and bivalent scFv types based on chromatography or such. Chromatography allows the separation of the structural isomers, but cannot identify the structures of separated sc(Fv)₂. The method of the present invention allows the identification of structural isomers separated by chromatography or such.

The single chain diabody type and bivalent scFv type are different in tertiary structure. Therefore, when any one of the three linker portions is cleaved by an enzyme or such, the products after cleavage differ between the single chain diabody type and bivalent scFv type.

Specifically, when sc(Fv)₂ has the arrangement of [variable region 1] (linker 1) [variable region 2] (linker 2) [variable region 3] (linker 3) [variable region 4], the cleavage in the portion of linker 1 or 3 does not result in the dissociation of the bivalent scFv type into two scFv units since the four variable regions are linked together via covalent or non-covalent bonds. However, the cleavage in the portion of linker 2 results in the dissociation of two scFv units: scFv comprising variable regions 1 and 2, and scFv comprising variable regions 3 and 4. The single chain diabody type does not dissociate into two units of scFv even when cleaved at any of the linker portions 1, 2, and 3 because the four variable regions are linked together via covalent or non-covalent bonds (see Fig. 4).

Thus, when the bivalent scFv type is cleaved at any one of the three linker portions, it gives two types of products, one containing four variable regions and the other containing two variable regions. In contrast, when the single chain diabody type is cleaved at any one of the three linker portions, it only gives products containing four variable regions.

As described above, it is possible to examine whether an sc(Fv)₂ is of a single chain diabody type or bivalent scFv type by cleaving one of the linker portions of sc(Fv) with an enzyme or such, and comparing the resulting products after cleavage. Thus, the present invention provides methods for analyzing the types of the structural isomers in sc(Fv)₂ compositions, which comprise the step of cleaving the linker portions of sc(Fv).

Specifically, such methods comprise the steps of:

- (a) cleaving linker portions of sc(Fv) in sc(Fv)₂ compositions; and
- (b) determining the molecular weight or structure of the products after cleavage.

Generally, the linker portions of sc(Fv)₂ are known to be sensitive to proteases and such, because the linker portions do not form a higher order structure (Hoedemaeker *et al.*, J Biol Chem. (1997) 272 : 29784-29789). The method for cleaving the linkers is not particularly limited, however cleavage by enzymes is preferred and cleavage by proteases is particularly preferred. Proteases to be used are not particularly limited. Any exopeptidase or endopeptidase can be used; however, endopeptidases are preferred for the purpose of cleaving linkers. Any endopeptidase, including serine protease, thiol peptidase, acidic protease, and metalloprotease, can be used. Those skilled in the art can suitably select an endopeptidase depending on the amino acid sequence and linker type. Such serine proteases include, for example, trypsin that specifically hydrolyzes the C terminal side of Arg or Lys residue and subtilisin that non-specifically hydrolyzes proteins and peptides. Alternatively, thiol proteases such as pyroglutamate aminopeptidase that specifically hydrolyzes pGlu residue at the N terminus of proteins and peptides, and papain that non-specifically hydrolyzes proteins and peptides can be used.

The number of linkers to be cleaved is not limited; however it is preferably one. Conditions for cleaving a single linker can be determined by methods known to those skilled in the art.

Furthermore, the molecular weight or structure of the products after cleavage are preferably determined while retaining non-covalent bonds between the variable regions. For example, native PAGE and gel filtration can be used.

All prior art documents cited herein are incorporated herein by reference in their entirety.

Examples

The present invention is specifically illustrated below using Examples, but it is not to be construed as being limited thereto.

[Example 1] Separation of structural isomers of VB22B sc(Fv)₂, determination of their structures, and activity assay

1-1. Preparation of anti-human Mpl antibody VB22B sc(Fv)₂

The anti-human Mpl antibody VB22B sc(Fv)₂ was prepared as described in PCT/JP2004/18506 (International Patent Application WO2005/56604). Specifically, cDNA for the antibody variable region from mouse hybridoma VB22B producing anti-human Mpl antibody

was cloned. A DNA comprising the nucleotide sequence (SEQ ID NO: 3) having the arrangement of VH-linker sequence-VL-linker sequence-VH-linker sequence-VL-Flag tag sequence was prepared using the nucleotide sequence encoding the linker sequence (GlyGlyGlyGlySer)₃ (SEQ ID NO: 1) and the nucleotide sequence encoding a FLAG sequence (AspTyrLysAspAspAspAspLys) (SEQ ID NO: 2). This DNA fragment was cloned into the expression vector pCXND3 to construct an expression vector for VB22B sc(Fv)₂. This vector was introduced into CHO-DG44 cells, and thus a stably expressing cell line was prepared. Specifically, a mixture of the expression vector (25 µg) and 0.75 ml of CHO-DG44 cells (1 x 10⁷ cells/ml) suspended in PBS was cooled on ice for 10 minutes, and transferred into a cuvette. The mixture was then pulsed at 1.5 kV and 25 µFD using Gene PulserII (BioRad). After 10 minutes of recovery at room temperature, the cells treated by electroporation were added to CHO-S-SFMII medium (Invitrogen) containing 500 µg/ml Geneticin (Invitrogen). Then, a VB22B sc(Fv)₂-producing CHO cell line was established through selection.

Then, the culture supernatant of this cell line was loaded onto a Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type I (Bio-Rad) column equilibrated with a 20 mM phosphate buffer (pH6.8), and VB22B sc(Fv)₂ was eluted in a stepwise manner with 250 mM phosphate buffer (pH6.8). The eluted fraction was concentrated on an ultrafilter, and then fractionated by gel filtration chromatography using a HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (Amersham Biosciences) column, and a fraction corresponding to the molecular weight range of about 40 kD to 70 kD was obtained. The fraction was loaded onto an Anti-Flag M2 Affinity Gel column (Sigma-Aldrich) equilibrated with a 50 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) containing 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20. The absorbed antibody was eluted with 100 mM glycine-HCl (pH3.5). The eluted fraction was immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH8.0), and loaded onto a HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (Amersham Biosciences) column for gel filtration chromatography. 20 mM acetate buffer (pH6.0) containing 150 mM NaCl and 0.01% Tween 80 was used in the gel filtration chromatography.

1-2. Separation of structural isomers of VB22B sc(Fv)₂

VB22B sc(Fv)₂ is an sc(Fv)₂ comprising the sequence of VH₁-linker-VL₂-linker-VH₃-linker-VL₄. Therefore, depending on the combinations of Fv (a molecule in which VH and VL are non-covalently linked), there would be two types of structural isomers: the bivalent scFv type in which each set of VH₁ and VL₂, and VH₃ and VL₄ form an Fv; and the single chain diabody type in which each set of VH₁ and VL₄, and VH₂ and VL₃ form an Fv (Fig. 1). As a result of examining structural isomer separation of VB22B sc(Fv)₂, the inventors succeeded in separating various structural isomers of VB22B sc(Fv)₂ by using anion exchange chromatography MONO Q (Amersham Biosciences) under the following elution

conditions.

<Elution conditions>

Mobile phase A: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0

Mobile phase B: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0

5 Flow rate: 1.0 ml/min

Gradient: B0% → B35% (30 min)

Under the conditions described above, VB22B sc(Fv)₂ was separated into four peaks. The chromatogram shown in Fig. 2 was obtained. The peaks were named pre peak 1, pre peak 2, peak 1, and peak 2 starting from the peak with the shortest retention time.

10 Sample solutions for peak 1 and peak 2 were introduced into Q-TOF mass spectrometer (Q ToF Ultima, Micro Mass) by infusion. Appended software (MassLynx) was used for a deconvolution of the obtained multivalent ion spectra (+). The result showed that the molecular weights were 54115 Da for peak1, and 54112 Da for peak 2. This suggests that the molecular weights for peak 1 and peak 2 are the same.

15 Peak 1 and peak 2 were suggested to be structural isomers (conformational isomers) since VB22B sc(Fv)₂ was not glycosylated and moreover, peak 1 and peak 2 had an identical amino acid primary structure but different tertiary structures that were separated by ion exchange chromatography. Previously published documents suggested the presence of such structural isomers; however, the finding described above allowed separation of structural isomers for the
20 first time.

1-3. Determination of the structures of the structural isomers of VB22B sc(Fv)₂

VB22B sc(Fv)₂ is an sc(Fv)₂ comprising the sequence of VH₁-linker-VL₂-linker-VH₃-linker-VL₄. Therefore, depending on the combinations of Fv (a
25 molecule in which VH and VL are non-covalently linked), two types of structural isomers are predicted to exist: the bivalent scFv type in which each set of VH₁ and VL₂, and VH₃ and VL₄ forms a Fv; and the single chain diabody type in which each set of VH₁ and VL₄, and VH₂ and VL₃ forms a Fv. Thus, peak 1 and peak 2 would be of those structural isomers described above.

30 Through investigations described herein, a protease-based limited proteolysis method was found as an analytical method for identifying the two types of structural isomers. The linker portions of sc(Fv)₂ are thought to have a relatively flexible structure and thus be less tolerant to proteases. Peak 1, peak 2, and VB22B bulk (peak 1:peak 2 = 1:3) were reacted with subtilisin A, a type of protease, under the following conditions.

<Reaction conditions>

35 20 mM sodium citrate, 150 mM NaCl, pH 7.5

VB22B sc(Fv)₂ peak 1 or peak 2: 0.14 mg/ml

Subtilisin A: 1 $\mu\text{g}/\text{m l}$

37°C, 30 min

Following the reaction described above, reducing SDS-PAGE was carried out using TrisGlycine SDS gel (12%). As a result, VB22B bulk (prior to separating the structural isomers), peak 1 and peak 2 all showed the same band pattern (Fig. 3). A band specific to each fragment resulting from the cleavage of VB22B sc(Fv)2 at the three linker portions was obtained. This indicated that the linker portions of VB22B sc(Fv)2 can be partially and limitedly degraded using the above-described reaction conditions.

As shown in Fig. 4, when cleavage occurs at one of the three linkers in the two types of structural isomers, in the non-denatured state, cleavage at any of the three linkers does not alter the apparent molecular weight in the structure of single chain diabody type in which VH and VL are non-covalently linked together. However, when cleavage at the middle linker of the bivalent scFv type occurs, molecular species with half the molecular weight is produced. Thus, VB22B sc(Fv)2 bulk, peak 1, and peak 2 after partial linker cleavage under the reaction conditions described above were analyzed by gel filtration chromatography using TSK Super2000 (TOSOH). Gel filtration chromatography was carried out using the following conditions:

Mobile phase: DPBS(-) pH 7.4

Flow rate: 0.2 ml/min

As shown in Fig. 5, the result showed no low molecular weight antibody peak in peak 2, while a low molecular weight antibody peak (about one half of the original molecular weight) was found in peak 1. VB22B sc(Fv)2 bulk, a mixture of peak 1 and peak 2, was also found to give a low molecular weight antibody peak with a level relevant to the abundance of peak 1. Thus, peak 1 and peak 2 were identified as bivalent scFv type and single chain diabody type, respectively.

This series of procedures enable the separation of structural isomers contained in VB22B sc(Fv)2 and identification of their structures. Previously published documents predict the structures of structural isomers based on model prediction. The present investigation discovered methods for identifying the structures of separated structural isomers. Furthermore, it allowed quantitative evaluation of the abundance ratio of the structural isomers - the bivalent scFv and single chain diabody structures contained in VB22B sc(Fv)2 - from the peak areas of ion exchange chromatography.

1-4. Biological activity assay of the structural isomers of VB22B sc(Fv)2

A document (Blood (2005) 105:562-566) has reported that anti-human Mpl antibody VB22B sc(Fv)2 exhibits a TPO-like agonistic activity. Thus, TPO-like agonistic activity of the

separated structural isomers was assessed using BaF3-human Mpl or BaF3-monkey Mpl that proliferate in a TPO-dependent manner.

Cells from each cell line were washed twice with RPMI 1640/1% FBS (fetal bovine serum) (Invitrogen), and then suspended in RPMI 1640/10% FBS to a concentration of 4×10^5 cells/ml. Cell suspensions were aliquoted at 60 μ l/well into a 96-well plate. Various concentrations of rhTPO (R&D) and samples of the structural isomers were prepared, and a 40- μ l aliquot was added into each well. The plates were then incubated at 37°C under 5% CO₂ for 24 hr. Immediately after an addition of 10- μ l aliquot of WST-8 reagent (Cell Count Reagent SF; Nacalai Tesque) into each well, absorbance was measured at 450 nm (and at 655 nm as a control) using Benchmark Plus. After two hours of incubation, absorbance was measured at 450 nm (and at 655 nm as a control) again. The WST-8 reagent changes colors at 450 nm in a color reaction that reflects the viable cell count. TPO-like agonistic activity was assessed using the change in absorbance during the two-hour incubation as an index.

Purified structural isomers of VB22B sc(Fv)2 were assayed for their TPO-like agonistic activity using BaF3-human Mpl and BaF3-monkey Mpl. The results are shown in Fig. 6. The comparison of agonistic activities between the structural isomers of peak 1 and peak 2 revealed that peak 2 exhibits a significantly higher activity. This suggests that anti-Mpl antibody sc(Fv)2 needs to form a single chain diabody structure in order to exert the TPO-like agonistic activity.

[Example 2] Separation of structural isomers of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2, identification of their structures, and activity assay

2-1. Preparation of humanized anti-human Mpl antibody hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2

Humanized antibodies were prepared by grafting a complementarity-determining region (hereinafter abbreviated as "CDR") into the framework regions (hereinafter abbreviated as "FR") of variable regions of VB22B sc(Fv)2 prepared in Example 1. Specifically, synthetic oligo DNAs of about 50 nucleotides were designed so as to make about 20 nucleotides available for hybridization. The synthetic oligo DNAs was also designed such that the resulting gene will have a nucleotide sequence (SEQ ID NO: 4) having the arrangement of VH-linker-sequence-VL-linker sequence-VH-linker sequence-VL, using a nucleotide sequence encoding the linker sequence (GlyGlyGlyGlySer)₃ (SEQ ID NO: 1). These synthetic oligo DNAs were assembled together by PCR to prepare the gene encoding the respective variable regions. To express the obtained gene in animal cells, an expression vector was constructed, the cell line CHO-DG44 constitutively expressing the antibody was prepared, and culture supernatants were collected by the same method as that described in Example 1-1. The humanized antibody hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2, which is not Flag-tagged, was purified from culture supernatants using a fusion protein of GST and MG10 (Gln213 to Ala231 in the amino

acid sequence of human Mpl), which is an epitope recognized by VB22B sc(Fv)2.

The MG10-GST fusion protein was purified using Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) according to the supplier's protocol. Then, the purified MG10-GST fusion protein was immobilized onto a HiTrap NHS-activated HP Column (Amersham Biosciences) to prepare an affinity column, according to the supplier's protocol. The culture supernatant of CHO cells expressing the humanized antibody hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 was loaded onto the MG10-GST fusion protein-immobilized column. The adsorbed humanized antibody hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 was eluted with 100 mM glycine-HCl (pH3.5)/0.01% Tween 80. Immediately after elution, the eluted fraction was neutralized with 1 M Tris-HCl (pH7.4), and was further subjected to gel filtration chromatography using a HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (Amersham Biosciences). 20 mM citrate buffer (pH7.5) containing 300 mM NaCl and 0.01% Tween 80 was used in the gel filtration chromatography.

2-2. Separation and purification of structural isomers of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2

hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 is an sc(Fv)2 comprising the sequence of VH₁-linker-VL₂-linker-VH₃-linker-VL₄. Therefore, as is the case of VB22B sc(Fv)2, depending on the combinations of Fv (a molecule in which VH and VL are non-covalently linked), there would be two types of structural isomers: the bivalent scFv type in which each set of VH₁ and VL₂, an VH₃ and VL₄ form a Fv; and the single chain diabody type in which each set of VH₁ and VL₄, and VH₂ and VL₃ form a Fv (Fig. 1).

The separation of structural isomers of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 was examined. The result suggested that various components of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 can be separated using cation exchange chromatography BioAssist S (TOSOH) under the following elution conditions:

Mobile phase A: 20 mM sodium phosphate, pH 7.5

Mobile phase B: 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.5

Flow rate: 0.8 ml/min

Gradient: B0% → B35% (30 min)

Under the conditions described above, hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 was separated into two peaks. The chromatogram shown in Fig. 7 was obtained. The peaks were named peak 1 and peak 2 starting from the peak with the shorter retention time.

The molecular weights for peak 1 and peak 2 were determined using Q-TOF mass spectrometer (Q ToF Ultima, Micro Mass). Sample solutions were introduced into Q-TOF by infusion. Appended software (MassLynx) was used for deconvolution of the obtained multivalent ion spectra (+). The result showed that the molecular weights were 53768 Da for peak 1, and 53769 Da for peak 2. Accordingly, the molecular weights for peak 1 and peak 2 were found to be identical.

Peptide mapping for peak 1 and peak 2 was carried out. After reduction and denaturation followed by carboxymethylation, the samples were degraded into peptide fragments using trypsin, and peptide maps were obtained using reversed-phase chromatography (YMC-Pack-ODS). The peptide maps for peak 1 and peak 2 were compared, which revealed that the mapping patterns of peak 1 and peak 2 were identical, as shown in Fig. 8. Thus, the amino acid primary structures were found to be identical to each other.

hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 was not glycosylated, and the molecular weights for peak 1 and peak 2 were identical when determined by TOF-MASS. In addition, the mapping patterns for peak 1 and peak 2 were identical to each other. Accordingly, these findings show that peak 1 and peak 2 are structural isomers (conformational isomers) having different tertiary structures.

hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 is an sc(Fv)2 comprising the sequence of VH₁-linker-VL₂-linker-VH₃-linker-VL₄, as shown in Fig. 1. Therefore, depending on the combinations of Fv (a molecule in which VH and VL are non-covalently linked), there would be two types of structural isomers: the bivalent scFv type in which each set of VH₁ and VL₂, and VH₃ and VL₄ forms a Fv; and the single chain diabody type in which each set of VH₁ and VL₄, and VH₂ and VL₃ forms a Fv. Thus, each of peak 1 and peak 2 would have the structure of either bivalent scFv type or single chain diabody type.

A protease-based limited proteolysis method was found as an analytical method for identifying the two types of structural isomers. The linker portions of sc(Fv)2 are thought to be relatively flexible in their structures and thus be less tolerant to proteases. Peak 1, peak 2, and hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 (peak 1:peak 2 = 1:4) were incubated with subtilisin A, a type of protease, under the following conditions:

20 mM sodium citrate, 150 mM NaCl, pH 7.5

hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak1 or peak2: 0.15 mg/ml

Subtilisin A: 10 µg/ml

37°C, 30 min

After the reaction, reducing SDS-PAGE was carried out using 12.5% Phastgel Homogeneous. According to the result, all of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulk, peak1, and peak2 showed the same band pattern, as shown in Fig. 9. A band specific to each fragment that resulted from the cleavage of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 at the three linker portions was obtained. This indicated that the linker portions of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 can be degraded partially and limitedly using the reaction condition described above.

As shown in Fig. 4, when cleavage occurs at one of the three linkers in the structures of bivalent scFv type and single chain diabody type, in the non-denatured state, cleavage at any of the three linkers does not alter the apparent molecular weight in the structure of single chain diabody type in which VH and VL are non-covalently linked together. However, when

cleavage at the middle linker of the bivalent scFv type occurs, molecular species with half the molecular weight are produced. Thus, hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulk, peak 1, and peak 2 after partial linker cleavage under the reaction conditions described above were analyzed by gel filtration chromatography using TSK Super2000 (TOSOH). Gel filtration chromatography was carried out under the following conditions:

Mobile phase: DPBS(-) pH 7.4

Flow rate: 0.2 ml/min

As shown in Fig. 10, the result showed that there was no low molecular weight antibody peak in peak 2, while there was one in peak 1 (about one half of the original molecular weight). hVB22B sc(Fv)2 u2-wz4 bulk, a mixture of peak 1 and peak 2, was also found to give a low molecular weight antibody peak with a level relevant to the abundance of peak 1. Thus, based on the result, peak 1 and peak 2 were identified as the bivalent scFv type and single chain diabody type, respectively.

2-3. Binding activity assay of the structural isomers of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2

The binding activities of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2, and peak 1 and peak 2 separated from hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 were evaluated as described below. Sensor Chip CM5 (Biacore) was placed in Biacore 3000 (Biacore), and a fusion protein of MG10 (Gln213 to Ala231 of human Mpl) and GST described in Section 2-1 was immobilized onto the chip by the amine-coupling method. HBS-EP Buffer (Biacore) was used as the running buffer for the measurement. The flow rate was 20 μ l/min. Six concentrations of each of humanized VB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulk, peak 1, and peak 2 within about 5 to 150 nM were prepared using HBS-EP Buffer. Each of the samples was injected over the above-described MG10-immobilized cell for 2 minutes to reveal the binding region. Then, the measurement was conducted for 2 minutes to reveal the dissociation region. VB22B sc(Fv)2 bound to the MG10-GST fusion protein was removed by injecting 20 mM HCl for 1 minute to recover the immobilized cell. The association rate constant (k_a) and dissociation rate constant (k_d) were calculated from the obtained sensorgram using the BIAevaluation Version 3.1 (Biacore) software applying the bivalent analyte model. The result showed that the dissociation constants (KD) for hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulk, peak 1, and peak 2 were 1.02×10^{-8} M, 1.24×10^{-8} M, 9.92×10^{-9} M, respectively, as shown in Table 1. The two types of structural isomers were found to have comparable binding activities.

Table 1

	$k_a(1/M_s) [\times 10^5]$	$k_d(1/s) [\times 10^{-3}]$	KD (nM)	
VB22B peak1	5.86 ± 0.06	7.27 ± 0.25	12.4 ± 0.05	n=3
VB22B peak2	5.71 ± 0.17	5.66 ± 0.24	9.92 ± 0.53	n=3
VB22B bulk	6.08 ± 0.30	6.17 ± 0.23	10.2 ± 0.8	n=3

2-4. Agonistic activity assay of structural isomers of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2

Peak 1, peak 2, and hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 were evaluated for their agonistic activities. As shown in Fig. 11, the agonistic activity was markedly different between the structural isomers. While peak 2 for the single chain diabody structure exhibited exceedingly high agonistic activity, the activity was extremely low in peak 1 for the bivalent scFv structure. The binding activity was comparable between the two types of structural isomers; however in contrast, their agonistic activities were significantly different. Neither separation nor identification of the structural isomers was carried out in previously published documents. The investigation described herein discovered for the first time that biological activities between the two types of the structural isomers differ.

The separation of the structural isomers in hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 and identification of their structures can be carried out by this Example. Furthermore, the abundance ratio of the structural isomers each having the bivalent scFv structure or single chain diabody structure in hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 can be quantitatively analyzed based on chromatographic peak areas. The agonistic activity was found to be significantly different between the bivalent scFv structure and single chain diabody structure of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2. Standardization tests to determine properties of the two types of structural isomers of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 and to quantitatively analyze the content ratio of each structural isomer are essential in the development of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 comprising the structural isomers with significantly different activity as pharmaceuticals.

[Example 3] Analysis of the abundance ratio of structural isomers of VB22B sc(Fv)2 with modified linkers and regulation of the ratio of structural isomers

VB22B sc(Fv)2 is an sc(Fv)2 comprising the sequence of VH₁-linker-VL₂-linker-VH₃-linker-VL₄. Therefore, depending on the combinations of Fv (a molecule in which VH and VL are non-covalently linked), there would be two types of structural isomers: the bivalent scFv type in which each set of VH₁ and VL₂, and VH₃ and VL₄ form a Fv; and the single chain diabody type in which each set of VH₁ and VL₄, and VH₂ and VL₃ form a Fv.

The linker in the middle is designated as the middle linker, and the linkers at the two

ends are designated as end linkers. Various VB22B sc(Fv)2 with the middle linker or end linkers of varying lengths were prepared as shown in Fig. 12, and the abundance ratio of the structural isomers was quantitatively analyzed under the following conditions:

Column: MONO Q (Amersham biosciences)

5 Mobile phase A: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0

Mobile phase B: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0

Flow rate: 1.0 ml/min

Gradient: B0% → B35% (30 min)

10 As a result, as shown in Fig. 13, the two types of structural isomers with linkers of arbitrary lengths were separated by the analytical method described in Example 2, and the abundance ratio of the structural isomers was determined. It was found that the bivalent scFv type and single chain diabody type ratio can be controlled by linker length. The use of this analytical method enables the design of linkers with adequate linker lengths to obtain structural isomers at a desired ratio.

15 Previously published documents were unable to quantitatively evaluate linker length-dependent abundance ratio of structural isomers since neither methods for identifying the structures of the two types of structural isomers nor quantitative analytical methods were available. Protein Engineering, (1993) 6(8), 989-995, Protein Engineering, (1994) 7(8), 1027-1033, and other documents have reported that in general, an adjacent pair of VH and VL
20 hardly forms a Fv when linker length is 12 or less. The investigation described herein revealed that when G5 or G10 was used, the single chain diabody type structure, in which the adjacent pairs of VH and VL have formed a Fv, was present, albeit in a small amount. Thus, the two types of structures (specifically, the structural isomers) are likely to exist irrespective of the type of linker. Quantitative analyses of the abundance ratio of structural isomers would thus be
25 necessary to develop sc(Fv)2 type molecules as pharmaceuticals when using any linker. This suggests that the methods of separation and analysis of the present invention, which allow quantitative analysis of the abundance ratio of the structural isomers and separation and purification of the isomers, are extremely useful in developing sc(Fv)2 type pharmaceutical
30 molecules.

[Example 4] Large scale purification of structural isomers using cation exchange chromatography (SOURCE 15S)

hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 was purified from culture supernatant of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2-expressing CHO cells used in Example 2-1. The culture supernatant was diluted three
35 times with purified water, and then was adjusted to pH 6.0 using 1 M acetic acid. Then, the resulting supernatant was loaded onto SP Sepharose Fast Flow column (Amersham Biosciences)

Comment [MH2]:

誤記の訂正について

“9. 分離精製の誤記”、および“12. 「制限酵素」の誤記”につきましては、前回、補正での対応となる旨お伝えいたしましたが、再度検討いたしました結果、翻訳文に反映させることが適切と判断いたしましたので、本修正案では修正を反映させております。JP 補正に関しましては、補正を提出いたします。

equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer (pH 6.0). The column was washed with the same buffer, and then the polypeptide adsorbed onto the column was eluted with a linear gradient of 0 to 0.5 M NaCl in the same buffer (Step 1). The resulting fractions were analyzed by reducing SDS-PAGE using TrisGlycine SDS gel (12%). Fractions containing hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 were collected.

The hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 fraction in step 1 was loaded onto a hydroxyapatite column (type I, 20 μ m; BIO-RAD) equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 6.8). The column was washed with the same buffer. The concentration of the phosphate buffer (pH 6.8) was raised linearly up to 160 mM to elute the polypeptide adsorbed to the column (Fig. 14). Small elution peaks appeared after the main peak. SDS-PAGE analysis revealed that these peaks were all from hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2. As shown in the right panel of Fig. 14, analytical gel filtration using a Superdex 200 PC 3.2/30 column (Amersham Biosciences) revealed that the main peak contained mostly hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 monomers and the latter peaks correspond to aggregate fractions for dimers and higher multimers of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2. This indicates that the monomer fraction of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 can be separated in this step.

The monomer fraction for hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 obtained in step 2 was diluted five times with purified water, and then loaded onto SOURCE 15S column (Amersham Biosciences) equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). The column was washed with the same buffer. The NaCl concentration was increased linearly from 0 mM up to 36 mM in the same buffer. Then, the NaCl concentration was fixed at 36 mM to maximize the separation of the two peaks during elution. As shown in Fig. 15, after elution of the two peaks of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2, the NaCl concentration was raised again, the polypeptide more strongly adsorbed to the column was eluted, and the column was washed. Analysis using the BioAssist S column described in Section 2-2 revealed that, of these two peaks, the main peak to be eluted first is peak 2, and the one to be eluted next is peak 1 (Fig. 16).

Both purified peak 1 and peak 2 for hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 were observed as single bands with a molecular weight of about 55 kDa in SDS-PAGE analyses using the above-described SDS gel under reducing and non-reducing conditions (Fig. 17). Furthermore, peak 1 and peak 2 for hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 each gave a single peak with apparent molecular weight of about 50 kDa in gel filtration chromatography analysis using the TSK Super2000 column described in Sections 1-3 (Fig. 18).

Thus, the present inventors succeeded in developing a method for purifying only the desired monomers of structural isomer of hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 without using gel filtration chromatography that is inadequate for large scale purification.

[Example 5] Preparation of VH/VL contact surface modified sc(Fv)₂ type, and analysis and identification of structural isomers thereof

5-1. Preparation of VH/VL contact surface modified sc(Fv)₂ type

Gln at position 39 of VH (at position 39 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 289 shown in WO 2005/56604) and Gln at position 38 of VL (at position 43 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 291 in WO 2005/56604), which are the amino acids that form the VH/VL contact surface in hVB22B u2-wz4 sc(Fv)₂ (hereinafter abbreviated as u2-wz4) prepared in Example 2, were modified by the following procedure. u2-wz4 has the arrangement of: [VH1] linker [VL2] linker [VH3] linker [VL4], which are linked with the amino acid linker sequence (GlyGlyGlyGlySer)_{x3} (SEQ ID NO: 1)), and transcribed and translated from the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 4. First, modified hVB22B u2-wz4(v1) sc(Fv)₂ gene (hereinafter abbreviated as v1; the nucleotide sequence is shown in SEQ ID NO: 5; the amino acid sequence is shown in SEQ ID NO: 6) with the following modifications was prepared.

Substitution with:

Glu (genetic codon: GAG) for Gln (genetic codon: CAG) at position 39 in VH1;
 Glu (genetic codon: GAG) for Gln (genetic codon: CAG) at position 38 in VL2;
 Lys (genetic codon: AAG) for Gln (genetic codon: CAG) at position 39 in VH3, and Lys (genetic codon: AAG) for Gln (genetic codon: CAG) at position 38 in VL4. Furthermore, modified hVB22B u2-wz4(v3) sc(Fv)₂ gene (hereinafter abbreviated as v3; the nucleotide sequence is shown in SEQ ID NO: 7; and the amino acid sequence is shown in SEQ ID NO: 8) with the following modifications was prepared.

Substitution with:

Glu (genetic codon: GAG) for Gln (genetic codon: CAG) at position 39 in VH1;
 Lys (genetic codon: AAG) for Gln (genetic codon: CAG) at position 38 in VL2;
 Lys (genetic codon: AAG) for Gln (genetic codon: CAG) at position 39 in VH3,
 and Glu (genetic codon: GAG) for Gln (genetic codon: CAG) at position 38 in VL4. The modification of the gene was carried out by introducing point mutations using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) according to the manufacturer's protocol. After determination of the nucleotide sequence of each gene, the resulting DNA fragments were cloned into the expression vector pCXND3 to construct expression vectors. These vectors were introduced into CHO-DG44 cells, and thus cell lines stably expressing the DNA fragments were prepared. Specifically, the expression vectors (20 µg) were combined with 0.75 ml of CHO-DG44 cells (1 × 10⁷ cells/ml) suspended in PBS. The resulting mixtures were cooled on ice for 10 minutes, and transferred into cuvettes. The mixtures were then pulsed at 1.5 kV and 25 µFD using Gene Pulser Xcell (BioRad). After 10 minutes of recovery at room temperature, the cells treated by electroporation were added to CHO-S-SFMII medium (Invitrogen)

containing 500 µg/ml Geneticin (Invitrogen). Then, v1-producing CHO cell line and v3-producing CHO cell line were established through selection.

The VH/VL contact surface-modified sc(Fv)2 type are not Flag-tagged. Thus, the antibodies were purified from culture supernatants using a fusion protein of GST with MG10 (Gln213 to Ala231 in the amino acid sequence of human Mpl) which is an epitope recognized by VB22B sc(Fv)2. The MG10-GST fusion protein was purified using Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Furthermore, an affinity column was prepared by immobilizing the purified MG10-GST fusion protein onto HiTrap NHS-activated HP (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol. A culture supernatant of v1-expressing CHO cell line or v3-expressing CHO cell line was loaded onto MG10-GST fusion protein-immobilized column to adsorb v1 or v3. Elution was carried out using 100 mM Glycine-HCl (pH 3.5)/0.01% Tween80. The elution fractions were immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 7.4). The monomer molecules was purified by gel filtration chromatography using HiLoad 16/60 Superdex200pg (Amersham Biosciences). The buffer used in the gel filtration chromatography was 20 mM citrate buffer (pH 7.5)/300 mM NaCl/ 0.01% Tween 80. The result of gel filtration chromatography shown in Fig. 19 revealed that, modified forms v1 and v3 in culture supernatants has a decreased proportion of aggregates that are dimer or higher multimers. However, the monomer ratios for v1 (89%) and v3 (77%) were increased in comparison with that of u2-wz4 before modification (59%). The modification of Amino acids on the VH/VL contact surface in the modified forms of v1 and v3 are inferred to have inhibited unfavorable association due to the electrostatic repulsion and enhanced favorable association. As described above, the inventors succeeded in efficiently expressing monomer molecules by controlling the association.

5-2. Analysis and identification of structural isomers of modified VH/VL contact surface sc(Fv)2 type

The obtained modified VH/VL contact surface form, v1 and v3, and the original form u2-wz4 were analyzed for the abundance ratio of the structural isomers by cation exchange chromatography and isoelectrofocusing. Furthermore, structural identification was carried out using the protease-based limited proteolysis method.

Cation exchange chromatography was performed as described below.

Column: TSK-gel Bioassist S; 4.6 mmφ x 50 mm (TOSOH)

Flow rate: 0.8 ml/min

Detection wavelength: 220nm

Elution conditions:

Eluent A : 20 mmol/l Phosphate buffer (pH 7.0)

Eluent B : 20 mmol/l Phosphate buffer / 500 mmol/l NaCl (pH 7.0)

Gradient:

Time (min)	B%
0	0
5	0
25	30
25.1	100
35	100
35.1	0

5 Isoelectric focusing was carried out as described below. PhastGel Dry IEF gel (Amersham Biosciences) was swollen in the gel swelling buffer described below for 30 minutes or longer. Samples were added to the pre-swollen gel, and electrophoresed using PhastSystem under the following electrophoresis conditions. After electrophoresis, the gel was soaked in 20% TCA solution for 30 minutes, and then washed three times or more with milliQ water, for 5 minutes each. The gel was stained by Coomassie or silver staining depending on the protein concentrations of the samples. Coomassie staining was carried out using 0.02% CBB containing 0.1% CuSO₄ (w/v) as the staining solution, and de-staining was carried out using 30% methanol containing 10% acetic acid. Silver staining was carried out using Silver Stain kit, Protein (Amersham Biosciences) according to the standard protocol appended to the kit.

20 <Gel swelling solution>

Pharmalyte 8.5-10	80 µl
Biolyte 7-9	10 µl
Biolyte 3-9	10 µl
20% Glycerol	2.0 ml

25 <Electrophoresis program>

SAMPLE APPLICATION DOWN AT step2	0 Vh
SAMPLE APPLICATION UP AT step3	0 Vh
Step 1 2000 V 2.5 mA 3.5 W 15°C	75 Vh
Step 2 200 V 2.5 mA 3.5 W 15°C	15 Vh
Step 3 2000 V 2.5 mA 3.5 W 15°C	410 Vh

30 The structural identification using protease-based limited proteolysis method was performed under the condition indicated below. Each of purified u2-wz4 peak 1 and peak 2, and modified forms v1 and v3 was reacted with subtilisin A under the following conditions:

20 mM sodium citrate, 150 mM NaCl, pH 7.5

35 hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak 1 or peak 2: 0.15 mg/ml

Subtilisin A: 10 µg/ml

37°C, 30 min

The resulting reaction solution was analyzed by gel filtration chromatography under the following conditions:

Column: TSKgel Super2000sw (TOSOH)

Eluent: 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH 7.0

Flow rate: 0.2 ml/min

Detection: 220 nm

The results of analyses of structural isomers using cation exchange chromatography and isoelectric focusing, which are shown in Figs. 20 and 21, revealed that 100% of the modified form v1 was expressed as a structural isomer of the single chain diabody type and 100% of the modified form v3 was expressed as a structural isomer of the bivalent scFv type whereas u2-wz4 expressed a mixture of the two structural isomers which contain bivalent scFv type (24%) and single chain diabody (76%). As shown in Fig. 22, the result of protease-based limited proteolysis also revealed that alike purified u2-wz4 peak 1, the modified form v3 gave a low molecular weight antibody peak whereas modified form v1 gave no low molecular weight antibody peak as in the purified u2-wz4 peak 2. This shows that modified form v1 is expressed as a structural isomer of the single chain diabody type while modified form v3 is expressed as a structural isomer of the bivalent scFv type.

[Example 6] Activity assay and stability assay of the VH/VL contact surface-modified sc(Fv)₂ 6-1. Biological activity assay of sc(Fv)₂ with modified VH/VL contact surface

Forms v1 and v3 with modified VH/VL contact surface were assayed for their agonistic activity by the method shown in Example 1. The agonistic activity was markedly different between the structural isomers. As shown in Fig. 11, peak 2 with the single chain diabody structure exhibited very high agonistic activity while the activity of peak 1 with the bivalent scFv structure was extremely low. As shown in Fig. 23, the activity of modified form v1 was comparable to that of peak 2 and the activity of modified form v3 was comparable to that of peak 1. This finding in terms of the biological activity also demonstrates that the modified form v1 has a single chain diabody structure, and the modified form v3 has a bivalent scFv structure.

6-2. Stability assay of sc(Fv)₂ with modified VH/VL contact surface

To evaluate the stability of purified u2-wz4 peak 1 and peak 2, and the modified forms v1 and v3, denaturation temperature (T_m) was measured by differential scanning calorimetry under the following conditions:

DSC: N-DSCII (Applied Thermodynamics)

Solution: 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, pH 7.0

Protein concentration: 0.1 mg/ml

Scanning speed: 1°C/min

Results of each DSC measurement are shown in Fig. 24. T_m values of the purified u2-wz4 peak 2 and the modified form v1 are comparable to that of the original form, suggesting that their stabilities are comparable to each other. The stability of the modified form v3 was slightly lower than that of purified u2-wz4 peak 1. It has been reported that regulating the contact surface by methods using knobs-into-hole technology markedly lowers the T_m value, thereby reducing the stability (Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26, 649-658). For example, T_m value of the original CH3 domain is 80.4°C when using this method, while T_m of the modified CH3 domain is 69.4°C in heterologous association of CH3 domain of IgG. In contrast, the present invention allowed regulation of the association without reducing the stability.

Next, the stability of purified u2-wz4 peak 1 and peak 2, and the modified form v1 and v3 with modified VH/VL contact surface, were evaluated by heat acceleration test under the following conditions.

<Conditions of heat acceleration>

Solution: 20 mM sodium citrate, pH 6.0

Protein concentration: 0.25 mg/ml

Acceleration condition: 40°C -6 days, 12 days

Samples treated by heat acceleration were analyzed by gel filtration chromatography and cation exchange chromatography under the conditions described below.

As shown in Fig. 25, the result of gel filtration chromatography analysis confirmed that the percentages of residual monomer were comparable between purified u2-wz4 peak 2 and the modified form v1, and thus the stability in association was comparable between the two. Furthermore, the percentage of residual monomer was almost the same between the purified u2-wz4 peak 1 and the modified form v3, confirming that the association stability is comparable between the two structural isomers.

As shown in Fig. 26, the result of cation exchange chromatography analysis showed that neither form v1 nor form v3 with modified VH/VL contact surface has undergone isomerization even after heating acceleration. In contrast, purified peak 1 of the original form isomerized to peak 2 and purified peak 2 of the original form isomerized to peak 1 through isomerization reaction. It was found that in addition to allowing expression of only one of the two types of structural isomers at 100%, each obtained structural isomer can be stably preserved without isomerization, by applying the modification of the VH/VL contact surface.

In this example, it was found that only one of the two types of structural isomers can be expressed at the rate of 100% through such modification of VH/VL contact surface applied for v1 and v3. As for controlling the VH/VL contact surface to obtain single chain antibodies

having the desired structure, method for controlling the structure of bispecific diabodies using knobs-into-hole technology (Protein Sci. 1997 Apr. 6(4):781-8, Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation., Zhu Z, Presta LG, Zapata G, Carter P.) is known. This method reports that the rate of formation of the target heterodimer structure increased from 72% to up to 92% through modification of a total of four amino acids per VH/VL contact surface. Meanwhile, the present invention succeeded in obtaining desired structures at the rate of 100% without reducing thermal stability and stability of the structural isomers by modifying four amino acids (two amino acids per VH/VL contact surface).

[Example 7] Separation of structural isomers of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 and identification of their structures

7-1. Preparation of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2

An sc(Fv)2 gene (the amino acid sequence, SEQ ID NO: 18; the nucleotide sequence, SEQ ID NO: 19) having the arrangement of VH-linker sequence-VL-linker sequence-VH-linker sequence-VL was linked using a gene encoding the linker sequence (GlyGlyGlyGlySer) \times 3 (SEQ ID NO: 1) was prepared using the VH and VL of humanized anti-human IL-6 receptor antibody reported by Sato K. *et al.* (Cancer Research (1993) 53:851-856). The obtained gene was inserted into the expression vector pMCDN to express the gene in animal cells. The vector construction procedure for the vector pMCDN is described below. The enhancer and promoter of mouse cytomegalovirus (mCMV), and the late polyadenylation site of simian virus 40 (SV40) were inserted into vector pUC19 and was named pMC. Next, DHFR- Δ E-rVH-PM1-f (see WO 92/ 19759) was digested at *Eco*RI and *Sma*I restriction sites to separate the antibody H chain gene from the vector. After recovery of the vector alone, an *Eco*RI-*Not*I-*Bam*HI adaptor (Takara Shuzo Co. Ltd.) was cloned into the vector. This vector was named pCHOI. The DHFR gene expressing region of pCHOI and the expression region of the Neomycin resistance gene of pCXN (Niwa *et al.*, Gene (1991) 108 : 193-200) were inserted into the pMC vector. This vector was named pMCDN. The constructed expression vector for the humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 was linearized using restriction enzymes, and then introduced into CHO-DG44 cells by gene transfer. Thus, an antibody-expressing cell line was established.

The cell line stably expressing the antibody was prepared by the procedure described below. Gene transfer to cells was achieved by electroporation using GenePulserXcell (Bio-Rad). Each antibody expression vector was mixed with 0.75 ml of CHO cells suspended in PBS (1×10^7 cells/ml). After being cooled on ice for 10 minutes, the mixtures were transferred into cuvettes and then pulsed at 1.5 kV and 25 μ FD. After 10 minutes of recovery at room temperature, the cells treated by electroporation were suspended in 40 ml of

Comment [MH3]:

誤記の訂正について

“9. 分離精製の誤記”、および“12. 「制限酵素」の誤記”につきましては、前回、補正での対応となる旨お伝えいたしましたが、再度検討いたしました結果、翻訳文に反映させることが適切と判断いたしましたので、本修正案では修正を反映させております。JP 補正に関しましては、補正を提出いたします。

CHO-S-SFMII medium (Invitrogen) supplemented with 1x HT supplement (Invitrogen). The cell suspensions were diluted 10 to 50 times with the same medium, and the resulting dilutes were aliquoted at 100 μ l/well into wells of 96-well culture plates. The cells were incubated in a CO₂ incubator (5% CO₂) for 24 hours, and then Geneticin (Invitrogen) was added at a concentration of 0.5 mg/ml. The cells were then cultured for 2 weeks. Colonies of drug resistant transformant cells were successively scaled-up, and the high-producing cell lines established were cultured on a large scale to obtain culture supernatants.

Utilizing the fact that the L chain of humanized anti-human IL-6 receptor antibody binds to Protein L, culture supernatants of CHO cells expressing the humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)₂ were loaded onto a column filled with Protein L (Actigen) to adsorb the humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)₂. The antibody was eluted with 100 mM Glycine-HCl (pH 2.7). The eluted fractions were immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 8.5), and loaded onto a HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (Amersham Biosciences) column for gel filtration chromatography. Dulbecco PBS was used in the gel filtration chromatography.

7-2. Separation and purification of the structural isomers of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)₂

The humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)₂ is an sc(Fv)₂ comprising the sequence of VH₁-linker-VL₂-linker-VH₃-linker-VL₄. Therefore, as is the case of VB22B in Example 1 and hVB22B in Example 2, depending on the combinations of Fv (a molecule in which VH and VL are non covalently linked), there would be two types of structural isomers of sc(Fv)₂: the bivalent scFv type in which each set of VH₁ and VL₂, and VH₃ and VL₄ form a Fv; and the single chain diabody type in which each set of VH₁ and VL₄, and VH₂ and VL₃ (Fig. 1) form a Fv. The inventors investigated the separation of the structural isomers of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)₂, and as a result succeeded in separating the structural isomers of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)₂ by cation exchange chromatography using BioAssist S (TOSOH) under the following elution conditions.

<Elution conditions>

Mobile phase: 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 75 mM NaCl
Flow rate: 0.8 ml/min
Gradient: isocratic (without gradient)

Under the conditions described above, the humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)₂ was separated into two peaks. The chromatogram shown in Fig. 27 was obtained. The peaks with short and long retention time were named peak 1 and peak 2, respectively. Peak 1 and peak 2 can be purified by the method described above. The result of

cation exchange chromatography analysis of purified peak 1 and peak 2 is shown in Fig. 28.

7-3. Identification of structural isomers of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2

Since the fractionated Peak 1 and peak 2 of the humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2, were considered to be structural isomers, the same protease-based limited proteolysis method as used in Examples, 1, 2, and 3 was used as an analytical method for identifying the two types of structural isomers. Peak 1 and peak 2 of the humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 were reacted with Subtilisin under the following conditions:

PBS (pH 7.4)

humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 peak 1 or peak 2: 0.05 mg/ml

Subtilisin A: 0.5 µg/ml

37°C, 60 min

Following the incubation described above, reducing SDS-PAGE was carried out using 12.5% Phastgel Homogeneous. According to the result, peak 1 and peak 2 both showed the same band pattern, as shown in Fig. 29. Peak 1 and peak 2 after partial linker cleavage under the reaction condition described above were analyzed by gel filtration chromatography using TSK Super2000 (TOSOH) under the following conditions:

Mobile phase: 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH 7.0

Flow rate: 0.2 ml/min

As shown in Fig. 30, the result showed that peak 1 gave no low molecular weight antibody peak, while peak 2 did (a low molecular weight antibody peak of about one half of the original molecular weight). According to the result described above, peak 1 and peak 2 were thus identified as the single chain diabody and bivalent scFv types, respectively. Fig. 27 indicates that the content of peak 2 is greater than that of peak 1 in the humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2, and therefore the bivalent scFv type is the major component and the single chain diabody type is the minor component in the humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2. In VB22B sc(Fv)2 of Example 1 and hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 of Example 2, the single chain diabody type was the major component. Separating structural isomers and identifying their structures would be important when sc(Fv)2s are developed as pharmaceuticals, because the content ratio of a structural isomer greatly varies depending on the differences in the sequences of variable regions in sc(Fv)2.

[Example 8] Activity assay of the structural isomers of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2

8-1. Establishment of BaF3 cell line coexpressing human gp130-expressing BaF3 cell line and human gp130/human IL-6 receptor

As described below, a human gp130-expressing BaF3 cell line was established to obtain a cell line that proliferates in an IL-6 dependent manner.

A full-length human gp130 cDNA (Hibi *et al.*, Cell (1990) 63: 1149-1157 (GenBank Accession No. NM_002184)) was amplified by PCR, and cloned into the expression vector pCOS2Zeo to construct pCOS2Zeo/gp130. The expression vector pCOS2Zeo was constructed by removing the DHFR gene expressing region from pCHOI (Hirata *et al.*, FEBS Letter (1994) 356:244-248) and the expression region of Zeocin resistance gene was inserted.

Ten µg of pCOS2Zeo/gp130 was mixed with BaF3 cells (0.8×10^7 cells) suspended in PBS, and the mixture was pulsed at 0.33 kV and 950 µFD using Gene Pulser (Bio-Rad). BaF3 cells treated by electroporation for gene transfer were cultured in RPMI1640 medium (Invitrogen) including 0.2 ng/ml mouse interleukin-3 (Peprotech) and 10% Fetal Bovine Serum (hereinafter abbreviated as FBS; HyClone) for a day and night. RPMI1640 medium containing 100 ng/ml human interleukin 6 (R&D), 100 ng/ml soluble human interleukin 6 receptor (R&D systems), and 10% FBS was added for selection. Thus, a human gp130-expressing BaF3 cell line (hereinafter abbreviated as BaF3/gp130) was established.

8-2. Human IL-6-neutralization activity assay of the structural isomers of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2

IL-6-neutralization activity was assayed as described below using BaF3/gp130 that proliferates in an IL-6 dependent manner. Purified structural isomers of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 were diluted to 10 µg/ml using RPMI1640 containing 10% FBS. A 3-fold dilution series (3, 6, 9, 12, 15 and 18 times), were prepared using each of these solutions, and a 50-µl aliquot was added to each well of 96-well plates (FALCON). Next, BaF3/gp130 were washed three times with RPMI1640 medium containing 10% FBS (HyClone), and then suspended at 5×10^4 cells/ml in RPMI1640 medium including 60 ng/ml human interleukin-6 (R&D systems), 60 ng/ml soluble human IL-6 receptor (a preparation of the inventors' company), and 10% FBS. A 50-µl aliquot of these was added to the antibody sample in each well. The soluble human IL-6 receptor was prepared by the procedure described below. A gene encoding the amino acids from position 1 to 344 of soluble human IL-6 receptor (Yamasaki *et al.*, Science (1988) 241 : 825-828 (GenBank No.X12830)) was introduced into CHO cells, and then the receptor was purified from the culture supernatants for preparation.

After 72 hours of culturing at 37°C and with 5% CO₂, 20 µl of WST-8 reagent (Cell Counting Kit-8; DOJINDO LABORATORIES) diluted two folds with PBS was added to each well. Immediately after that, absorbance at 450 nm (reference wavelength: 620 nm) was measured using SUNRISE CLASSIC (TECAN). After two hours of culture, absorbance at 450 nm (reference wavelength: 620 nm) was measured again and the IL-6 neutralization activity was

evaluated using the absorbance change during the two hours as an index.

As shown in Fig. 31, the neutralization activities of the structural isomers (peak 1 and peak 2) of humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 were comparable to those of the purified samples (bulk) before fractionation. The activity was found to be markedly different between the two types of structural isomers of VB22B sc(Fv)2 in Example 1 and the same of hVB22B sc(Fv)2 in Example 2. There was no difference in the neutralization activity between the two types of isomers of the humanized anti-human IL-6 receptor antibody sc(Fv)2 of this present Example. Thus, the activity difference between the two types of structural isomers of sc(Fv)2 would vary depending on the type of target antigen and the amino acid sequence of the sc(Fv)2 molecule. For this reason, to develop sc(Fv)2 molecules as pharmaceuticals, separation of the structural isomers, structural identification, and regulation of the structural isomers are considered important. As described in Example 6, each structural isomer can undergo isomerization during storage. Therefore, separation and identification of the structural isomers, and regulation of the structural isomers are also important from the view point of quality standardization of sc(Fv)2 preparations.

[Example 9] Method for obtaining single chain diabody of VB22B sc(Fv)2 with a high yield

Each of the single chain diabody (peak 2) and bivalent scFv (peak 1) purified from VB22B sc(Fv)2 was incubated at 40°C with the conditions of 20 mM sodium acetate/150 mM NaCl (pH 6.0). The ratio of peak 1 and peak 2 was determined by the anion exchange chromatography method described in Example 1. The result showed that the peak area of peak 1 decreased, and in turn the peak area of peak 2 increased, as shown in Fig. 32. The agonistic activity of the sample prepared by incubating peak 1 for 6 days under the same condition was assayed by the method described in Example 1. As shown in Fig. 33, the agonistic activity drastically increased as compared to the sample before incubation. As described in Example 1, the activity of peak 1 was significantly lower than that of the single chain diabody peak 2. Thus, the bivalent scFv peak 1 was found to undergo structure conversion (the structural isomer isomerizes) to become peak 2 of the single chain diabody with higher activity through incubation in 20 mM sodium acetate/150mM NaCl (pH 6.0) at 40°C. Thus, the finding described above showed that the content ratio of peak 2 can be increased by exposing a mixture of the bivalent scFv and single chain diabody at appropriate conditions which allows the conversion of the bivalent scFv of peak1 into the single chain diabody of peak2. By using the method of isomerizing peak 1 to peak 2, the single chain diabody of peak 2 can be prepared with a high yield by isomerizing peak 1 to peak 2 in a mixture in which peak 1 and peak 2 had been produced by the cells.

[Example 10] Method for obtaining single chain diabody type of hVB22B sc(Fv)2 with a high yield

The bivalent scFv (peak 1) purified from hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 in Example 4 was incubated at 25°C for 10 days under 30 types of conditions in total: 20 mM sodium citrate, and 0, 150, or 300 mM NaCl at pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, or 7.5. The ratio of peak 1 and peak 2 was determined by the cation exchange chromatography method shown in Example 1. The result showed that the abundance ratio of peak 2 increased in comparison with that before incubation, as shown in Fig. 34. This finding showed that, in hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2, the bivalent scFv of peak 1 was also structurally converted into the single chain diabody peak 2.

The isomerization rate was found to become greater as pH and salt concentration decrease. By using the method of isomerizing peak 1 to peak 2, a high yield of single chain diabody of peak 2 can be obtained by isomerizing peak 1 to peak 2 in a mixture in which peak 1 to peak 2 had been produced by the cells.

15 Industrial applicability

The present invention provides methods for separating and obtaining the two types of structural isomers in sc(Fv)2 compositions, methods for identifying the structures of the separated two types of structural isomers, and methods for quantitatively analyzing the two types of structural isomers. The present invention also provides methods for increasing the percentage of a specific structural isomer in sc(Fv)2 compositions by adjusting linker lengths. The present invention further provides methods for controlling the formation of the structural isomers by modifying the amino acids in the variable regions. Use of these methods described above allows the production of pharmaceutical compositions comprising specific structural isomers of sc(Fv)2 as active ingredients and to provide pharmaceutical compositions with activity higher than previous compositions. Furthermore, the present invention enables the provision of sc(Fv)2s as pharmaceutical compositions, in which the structural isomer content ratio of the sc(Fv)2s has been controlled by standardization tests, which are essential in developing pharmaceuticals..

CLAIMS

1. A method for producing a pharmaceutical sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:
(a) separating structural isomers in the sc(Fv)₂ composition, and
5 (b) obtaining a specific structural isomer from the separated structural isomers.
2. A method for producing a pharmaceutical sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:
(a) pre-identifying a structural isomer with higher activity by comparing the activities of structural isomers of sc(Fv)₂;
10 (b) separating structural isomers in the sc(Fv)₂ composition; and
(c) obtaining the structural isomer with higher activity identified in step (a).
3. A method for producing a pharmaceutical sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:
(a) determining a linker length so that the structural isomer ratio in an sc(Fv)₂ composition
15 would be of a preferred value;
(b) preparing a sc(Fv)₂ composition that has the linker length determined in step (a);
(c) separating structural isomers in the prepared sc(Fv)₂ composition; and
(d) obtaining a specific structural isomer from the separated structural isomers.
- 20 4. A method for producing a pharmaceutical sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:
(a) preparing multiple sc(Fv)₂ compositions with linkers of varying lengths;
(b) selecting an sc(Fv)₂ with linker(s) that give a preferred of structural isomer ratio in an sc(Fv)₂ composition;
(c) preparing an sc(Fv)₂ composition in which the linker lengths are the same as those of sc(Fv)₂
25 selected in step (b);
(d) separating the structural isomers in the prepared sc(Fv)₂ composition; and
(e) obtaining a specific structural isomer from the separated structural isomers.
5. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the structural isomer is of single chain
30 diabody type or bivalent scFv type.
6. The method of any one of claims 1 to 5, wherein the structural isomer has an agonistic activity.
- 35 7. The method of any one of claims 1 to 6, wherein a linker of sc(Fv)₂ is 15 amino acids in length.

8. A pharmaceutical composition prepared by the production method of any one of claims 1 to 7.

5 9. A pharmaceutical composition, wherein the proportion of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂ composition is 80% or greater.

10. The pharmaceutical composition of claim 9, wherein the structural isomer is of single chain diabody type or bivalent scFv type.

10 11. The pharmaceutical composition of claim 9 or 10, wherein the structural isomer binds to a receptor.

15 12. The pharmaceutical composition of any one of claims 9 to 11, wherein the structural isomer has an agonistic activity.

13. The pharmaceutical composition of claims 9 to 12, wherein a linker of sc(Fv)₂ is 15 amino acids in length.

20 14. A method for controlling the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the step of altering the structural isomer proportion in the sc(Fv)₂ composition.

15. A method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the step of increasing the proportion of a specific structural isomer in the sc(Fv)₂ composition.

25 16. A method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:
(a) separating structural isomers in an sc(Fv)₂ composition;
(b) obtaining a specific structural isomer from the separated structural isomers.

30 17. A method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:
(a) pre-identifying a structural isomer with higher activity by comparing the activities of structural isomers of sc(Fv)₂;
(b) separating structural isomers in the sc(Fv)₂ composition; and
(c) obtaining the structural isomer with higher activity that was identified in step (a).

35 18. A method for increasing the activity of an sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:

- (a) applying an sc(Fv)₂ composition onto an ion exchange column; and
- (b) removing a specific structural isomer.

19. The method of any one of claims 14 to 18, wherein the structural isomer is of single chain
5 diabody type or bivalent scFv type.

20. A method for increasing the content ratio of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂
composition, which comprises the step of heating the sc(Fv)₂ composition.

10 21. The method of claim 20, wherein the structural isomer is of single chain diabody type or
bivalent scFv type.

22. A method for increasing the content ratio of the single chain diabody type in an sc(Fv)₂
composition, comprising the step of incubating the sc(Fv)₂ composition at 15°C to 50°C.

15 23. A method for increasing the content ratio of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂
composition, which comprises the step of substituting, with a charged amino acid residue, an
amino acid residue at the contact surface of heavy chain and light chain variable regions in the
sc(Fv)₂.

20 24. A method for increasing the content ratio of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂
composition, which comprises the step of substituting the following amino acid residues with an
amino acid residue having the same type of charge:

- 25 (1) the amino acid residue at position 39 in the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and
(2) the amino acid residue at position 38 in the amino acid sequence of the light chain variable
region of sc(Fv)₂.

25 25. A method for increasing the content ratio of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂
composition, which comprises the step of substituting the following amino acid residues with an
amino acid residue having the same type of charge:

- 30 (1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable
region of sc(Fv)₂; and
(2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable
region of sc(Fv)₂.

35 26. A method for increasing the content ratio of a specific structural isomer in an sc(Fv)₂

composition, which comprises the step of substituting either one of the following amino acid residues with a charged amino acid residue:

(1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable region of sc(Fv)2; and

5 (2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)2.

27. A method for increasing the activity of an sc(Fv)2 composition, which comprises the step of substituting, with a charged amino acid residue, an amino acid residue at the contact surface of
10 heavy chain and light chain variable regions of sc(Fv)2.

28. A method for increasing the activity of an sc(Fv)2 composition, comprising the step of substituting the following amino acid residues with an amino acid residue having the same type of charge:

15 (1) the amino acid residue at position 39 in the heavy chain variable region of sc(Fv)2; and

(2) the amino acid residue at position 38 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)2.

29. A method for increasing the activity of an sc(Fv)2 composition, comprising the step of substituting the following amino acid residues with an amino acid residue having the same type of charge:

20 (1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable region of sc(Fv)2; and

(2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable
25 region of sc(Fv)2.

30. A method for increasing the activity of an sc(Fv)2 composition comprising the step of substituting either one of the following amino acid residues with a charged amino acid residue:

(1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable
30 region of sc(Fv)2; and

(2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)2.

31. A method for suppressing the isomerization of a structural isomer in an sc(Fv)2

35 composition, which comprises the step of substituting, with a charged amino acid residue, an amino acid residue at the contact surface of heavy chain and light chain variable regions of

sc(Fv)₂.

32. A method for suppressing the isomerization of a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, comprising the step of substituting the following amino acid residues with an amino acid residue having the same type of charge:

- (1) the amino acid residue at position 39 in the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and
- (2) the amino acid residue at position 38 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂.

33. A method for suppressing the isomerization of a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, comprising the step of substituting the following amino residues with an amino acid residue having the same type of charge:

- (1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and
- (2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂.

34. A method for suppressing the isomerization of a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, comprising the step of substituting either one of the following amino acid residues with a charged amino acid residue:

- (1) the amino acid residue at position 45 in the amino acid sequence of the heavy chain variable region of sc(Fv)₂; and
- (2) the amino acid residue at position 44 in the amino acid sequence of the light chain variable region of sc(Fv)₂.

35. A method for controlling the proportion of a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition comprising the step of adjusting the length of a linker in sc(Fv)₂.

36. The method of claim 35, wherein the structural isomer is of a single chain diabody type or bivalent scFv type.

37. A method for increasing the proportion of the single chain diabody type in an sc(Fv)₂ composition, which comprises the step of adjusting the lengths of both end linkers of sc(Fv)₂ to 0 to 12 amino acids and the length of the middle linker to 10 to 30 amino acids.

38. A method for increasing the proportion of the bivalent scFv type in an sc(Fv)₂ composition,

which comprises the step of adjusting the lengths of both end linkers of sc(Fv)₂ to 12 to 30 amino acids and the length of the middle linker to 0 to 10 amino acids.

5 39. A method for producing an sc(Fv)₂ composition in which the content ratio of a single chain diabody type is 80% or greater, which comprises the step of adjusting the lengths of both end linkers of sc(Fv)₂ to 0 to 12 amino acids and the length of the middle linker to 0 to 10 amino acids.

10 40. A method for producing an sc(Fv)₂ composition in which the content ratio of bivalent scFv type is 80% or greater, which comprises the step of adjusting the lengths of both end linkers of sc(Fv)₂ to 12 to 30 amino acids and the length of the middle linker to 0 to 10 amino acids.

15 41. A method for analyzing a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition, comprising the step of cleaving a linker or a region adjacent to the linker in sc(Fv)₂.

42. The method of claim 41, wherein the linker or the region nearby the linker is cleaved by a treatment with an enzyme.

20 43. The method of claim 41 or 42, wherein the structural isomer is of a single chain diabody type or bivalent scFv type.

44. A method for analyzing a structural isomer in an sc(Fv)₂ composition comprising the steps of:

- 25 (a) treating the sc(Fv)₂ composition with an enzyme; and
(b) determining the molecular weight or structure of the product after treatment.

ABSTRACT

Structural isomers in sc(Fv)₂ compositions of anti-human Mpl antibody and humanized anti-human Mpl antibody were separated, and the obtained structural isomers were cleaved at their linkers to confirm that the structural isomers are of single chain diabody type and bivalent scFv type. In addition, the agonistic activities of these structural isomers were revealed to be significantly different. Furthermore, the present inventors discovered that the content ratio of the structural isomers in sc(Fv)₂ compositions could be regulated by altering temperature, modifying lengths of the linkers of sc(Fv)₂, or amino acids in their variable regions.

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 10 月 12 日 (12.10.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/106903 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/306800
- (22) 国際出願日: 2006 年 3 月 31 日 (31.03.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2005-101711 2005 年 3 月 31 日 (31.03.2005) JP
特願 2005-378467
2005 年 12 月 28 日 (28.12.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 井川 智之 (IGAWA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 角田 浩行 (TSUNODA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 古賀 明子 (KOGA, Akiko) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 菊地 康文 (KIKUCHI, Yasufumi) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: sc(Fv)2 STRUCTURAL ISOMERS

(54) 発明の名称: sc(Fv)2 構造異性体

(57) Abstract: By separating structural isomers from a human Mp1 antibody and humanized antihuman Mp1 antibody composition and cleaving linkers in the obtained structural isomers, it is confirmed that these structural isomers are in the single chain diabody type and the bivalent scFv type. It is also clarified that these structural isomers are largely different from each other in agonistic activity. Furthermore, it is clarified that the ratio of the structural isomers contained in the sc(Fv)2 composition can be controlled depending on a change in temperature or modification in the sc(Fv)2 linker length and modification in the amino acids in the variable domain.

(57) 要約: ヒト Mp1 抗体およびヒト化抗ヒト Mp1 抗体の sc(Fv)2 組成物中の構造異性体を分離し、得られた構造異性体のリンカーを切断することにより、構造異性体が single chain diabody 型と bivalent scFv 型であることを確認した。また、これら構造異性体のアゴニスト活性が著しく異なることを明らかにした。さらに、本発明者らは、温度変化や sc(Fv)2 のリンカーの長さおよび可変領域のアミノ酸の改変により、sc(Fv)2 組成物中の構造異性体の含有比率を調節可能であることを明らかにした。

WO 2006/106903 A1

明 細 書

sc(Fv)2構造異性体

技術分野

[0001] 本発明は、sc(Fv)2医薬組成物、並びにその製造方法に関する。

背景技術

[0002] sc(Fv)2は2つの軽鎖可変領域(VL)と2つの重鎖可変領域(VH)の4つの可変領域をリンカーなどで結合して一本鎖にした抗体である(Hudson et al, J Immunol. Methods 1999;231:177-189)。

[0003] 例えば、 VH_1 -linker- VL_2 -linker- VH_3 -linker- VL_4 や VL_2 -linker- VH_1 -linker- VL_4 -linker- VH_3 の配列を有する一本鎖抗体が知られている。sc(Fv)2の構造は、Fv(VH,VL間で非共有結合した分子)の組み合わせにより、 VH_1 と VL_2 、 VH_3 と VL_4 がそれぞれFvを形成するsc(Fv)2と、 VH_1 と VL_4 、 VH_3 と VL_2 がそれぞれFvを形成するsc(Fv)2の2種類の構造異性体が存在すると考えられる。

[0004] しかしながら、これまで、sc(Fv)2の研究はBispecific sc(Fv)2に関するものが多かった為、sc(Fv)2の構造異性体についてはほとんど報告がない。

[0005] Bispecific sc(Fv)2は、 VH_1 -linker- VL_2 -linker- VH_3 -linker- VL_4 の配列において、 VH_1 と VL_4 、および、 VH_3 と VL_2 (あるいは VH_1 と VL_2 、および、 VH_3 と VL_4)が異なるモノクローナル抗体由来の可変領域をもつsc(Fv)2である。Bispecific sc(Fv)2の場合には、 VH_1 と VL_4 、または、 VH_3 と VL_2 (あるいは VH_1 と VL_2 、または、 VH_3 と VL_4)が同じモノクローナル抗体由来であることからFvを形成する効率が高くなり、構造異性体の出現はある程度抑制されると考えられる。実際に、リンカー長を15-5-15と15-15-15のbispecific sc(Fv)2を作製しても、活性は変わらないことが報告されている(非特許文献5)。従って、Bispecific sc(Fv)2の場合は構造異性体に関しては詳細な言及がされていないことが多い。例えば、非特許文献3、4、8、9は、bispecificな結合活性を確認することにより正しい組み合わせのFvが存在することは示しているが、正しくないFvの組み合わせの存在比率や両者の存在比の定量的な評価に関する記載はない。また、非特許文献6は、Bispecific sc(Fv)2のリンカーの長さを変化させること(両端あるいは中央のリンカ

一の長さの改変)により、monomer、dimerの構造変換を確認しているが、sc(Fv)₂の構造異性体については分子構造モデル予測での議論に留まっており、実際の試料における構造異性体の存在比率や構造の同定に関する記載はない。

- [0006] また、sc(Fv)₂の構造異性体について着目されていなかったので、構造異性体の制御についても詳細な検討はなされていない。非特許文献10においても、リンカーの長さを5-15-5あるいは15-5-15にすることで、それぞれsingle chain diabodyあるいはbivalent scFvの構造を取ることを予測している。これは、scFvにおいてリンカーの長さが12以下の場合、一般的に隣り合うVHとVLはFvを形成しにくい(つまりmonomerを形成しにくい)ことが報告されているためである。しかしながら、非特許文献2において、リンカーの長さが10あるいは5のFvにおいても少量だがmonomerが形成することが報告されており、非特許文献10におけるリンカーの長さを5-15-5あるいは15-5-15の場合においても、得られたsc(Fv)₂は必ずしも100%のsingle chain diabodyあるいはbivalent scFvの構造であるとは限らない。
- [0007] これまでの報告では構造異性体に関してはFvの組み合わせとリンカーの長さからの構造予測のみで、構造異性体の含有比率の定量的分析や得られた構造が目的の構造であるかどうかの確認・証明は行われておらず、構造異性体が十分に評価および制御されているとは言えない。すなわち、いかなるリンカーの長さのsc(Fv)₂においても、Fvの組み合わせとリンカーの長さからは構造異性体の存在比を予測することは極めて困難であり、2組のVH、VLを有するsc(Fv)₂型分子においては2つの構造異性体の存在は考えなければならない問題である。
- [0008] 低分子化合物に関しては、光学異性体や幾何異性体の分離方法は多数知られているが、これまでにタンパク質の異性体を分離する方法は報告されていない。タンパク質の1アミノ酸の違いを分離するような方法はすでに多数報告されているが、完全に同一なアミノ酸一次配列を有する2つの構造的な異性体を分離する方法はこれまでに報告がない。sc(Fv)₂の構造異性体に関しても同様で、従来技術ではsc(Fv)₂の2種類の構造異性体の分離分析法、確認方法はこれまでに存在しなかった。
- [0009] これまでにsc(Fv)₂の構造異性体の分離方法が存在しなかったことから、2種類の構造異性体の間での活性の違いに着目した報告はない。Bispecific sc(Fv)₂においては

、構造異性体により正しいFvの組み合わせと正しくないFvの組み合わせの間で活性が大きく異なることは当然予想されるが、Monospecific sc(Fv)2においては、同じ2価である構造異性体間で活性の違いに関しては予想し難い。非特許文献10においては、2つの構造異性体間で活性が異なる可能性は考えず、活性(結合活性)は構造異性体の混合物で測定している。これはsc(Fv)2の構造異性体の分離精製の困難さから、それぞれの構造異性体を高純度に調製し活性を厳密に比較することができなかったためである。

- [0010] リンカーの長さを改変したsc(Fv)2においても、リンカーの長さから想定される2つの構造異性体をそれぞれモデル予測ではなく“同定”し、その構造異性体の含有比率を定量的に評価することはこれまで不可能であった。そのため、sc(Fv)2のリンカーの長さで構造異性体の含有比率の関係を明らかにした定量的な検討はこれまで実施されておらず、実質的にリンカーの長さにより構造異性体の含有比率をコントロールした報告はない。
- [0011] リンカーの長さを変化させることはsc(Fv)2の2つの抗原結合部位間の距離を変えることになることから、リンカーの長さはその生物活性(特にレセプターを二量体化するようなアゴニスト活性)に影響する可能性がある。そのため抗原の種類により、2つの抗原結合部位間距離はリンカーの長さによって任意に調節可能であることが望ましい。また、リンカーの長さは安定性に大きく影響を及ぼすことが報告されており(非特許文献1、非特許文献2)、scFvでは一般にリンカーが短いほど安定性が低いことが知られている。sc(Fv)2においても同様に考えられ、中央のリンカーを短くすることによって、会合体(dimer)が生成しやすくなることが報告されており(非特許文献6)、安定性の高いsc(Fv)2を作製するためにはリンカーの長さは任意に調節可能であることが望ましい。このようなことから、sc(Fv)2を医薬品として開発する場合、任意のリンカーの長さにおいて目的の構造異性体を単離できることが望ましいと考えられる。しかしながら、これまで任意のリンカー長を持つsc(Fv)2において、bivalent scFvとsingle chain diabodyの2種類の構造異性体をそれぞれ単離した報告はない。
- [0012] 構造異性体を含むsc(Fv)2を医薬品として開発するためには、目的の構造異性体のみを分離精製し、構造異性体の一方のみを含む原薬を製造すること、あるいは、原

薬が構造異性体混合物の場合には、2種類の構造異性体の性質を決定し、各構造異性体の含有比率を定量的に分析する規格試験を実施することが必要となる。しかしながら、これまでsc(Fv)₂の構造異性体の分離精製・定量的分析・構造同定する方法は知られていない。

[0013] また、リンカーの長さによるscFvのmonomer/dimer/trimer/tetramerの存在比率を制御する方法が報告されているが、sc(Fv)₂の構造異性体に関しては、上述のとおり、構造異性体の定量的分析法が見出されていないため、リンカーの長さによる構造異性体存在比率の制御方法はこれまでに報告されていない。

[0014] 非特許文献1:Protein Engineering, 1993, 6(8), 989-995

非特許文献2:Protein Engineering, 1994, 7(8), 1027-1033

非特許文献3:Journal of Immunology, 1994, 152, 5368-5374

非特許文献4:Journal of Immunology, 1995, 154, 4576-4582

非特許文献5:PNAS, 1995, 92, 7021-7025

非特許文献6:Journal of Molecular Biology, 1999, 293, 41-56

非特許文献7:Protein Engineering, 2001, 14(10), 815-823

非特許文献8:Journal of Molecular Biology, 2003, 330, 99-111

非特許文献9:Protein Eng Des Sel. 2004 Apr, 17(4), 357-66

非特許文献10:Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281

非特許文献11:Int. J. Cancer, 1998, 77, 763-772

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0015] 本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、sc(Fv)₂の特定の構造異性体を有効成分として含有する医薬組成物、およびその製造方法、および医薬品開発のための構造異性体の構造決定方法と規格試験法を提供することにある。また、sc(Fv)₂組成物中の特定の構造異性体の割合を増加させる方法、該方法を利用したsc(Fv)₂組成物の活性を増加させる方法、sc(Fv)₂組成物中の構造異性体を分析する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0016] ヒトMpl抗体およびヒト化抗ヒトMpl抗体のsc(Fv)2組成物中の構造異性体を分離し、得られた構造異性体のリンカー又はリンカー近傍領域を切断することにより、構造異性体がsingle chain diabody型とbivalent scFv型であることを確認した。また、これら構造異性体のアゴニスト活性が著しく異なることを明らかにした。

[0017] さらに、本発明者らは、sc(Fv)2のリンカーの長さの改変により、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の含有比率を調節可能であることを明らかにした。

[0018] 本発明は、以下の〔1〕～〔44〕を提供するものである。

〔1〕以下の工程を含むsc(Fv)2医薬組成物の製造方法。

(a) sc(Fv)2組成物中の構造異性体を分離する工程

(b) 分離された構造異性体のうち、特定の構造異性体を取得する工程

〔2〕以下の工程を含むsc(Fv)2医薬組成物の製造方法。

(a) sc(Fv)2の構造異性体の活性を比較して高活性の構造異性体をあらかじめ決定する工程

(b) sc(Fv)2組成物中の構造異性体を分離する工程

(c) 工程(a)により決定された高活性の構造異性体を取得する工程

〔3〕以下の工程を含むsc(Fv)2医薬組成物の製造方法。

(a) sc(Fv)2組成物中の構造異性体の比率が好ましい値になるようにリンカーの長さを決定する工程

(b) 工程(a)で決定されたリンカーの長さを有するsc(Fv)2組成物を作製する工程

(c) 作製されたsc(Fv)2組成物中の構造異性体を分離する工程

(d) 分離された構造異性体のうち、特定の構造異性体を取得する工程

〔4〕以下の工程を含むsc(Fv)2医薬組成物の製造方法。

(a) リンカーの長さが異なる複数のsc(Fv)2組成物を作製する工程

(b) sc(Fv)2組成物中の構造異性体の比率が好ましい値となるリンカーを有するsc(Fv)2を選択する工程

(c) 工程(b)で選択されたsc(Fv)2のリンカーと同じ長さのリンカーを有するsc(Fv)2組成物を作製する工程

(d) 作製されたsc(Fv)2組成物中の構造異性体を分離する工程

(e) 分離された構造異性体のうち、特定の構造異性体を取得する工程

[5] 構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 構造異性体がアゴニスト活性を有することを特徴とする[1]～[5]のいずれかに記載の製造方法。

[7] sc(Fv)₂のリンカーが15アミノ酸であることを特徴とする[1]～[6]のいずれかに記載の製造方法。

[8] [1]～[7]のいずれかに記載の製造方法により作製された医薬組成物。

[9] sc(Fv)₂組成物中の特定の構造異性体の割合が80%以上であることを特徴とする医薬組成物。

[10] 構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である[9]に記載の医薬組成物。

[11] 構造異性体が受容体に結合することを特徴とする[9]または[10]に記載の医薬組成物。

[12] 構造異性体がアゴニスト活性を有することを特徴とする[9]～[11]のいずれかに記載の医薬組成物。

[13] sc(Fv)₂のリンカーが15アミノ酸である[9]～[12]のいずれかに記載の医薬組成物。

[14] sc(Fv)₂組成物中の構造異性体の割合を変化させる工程を含む、sc(Fv)₂組成物の活性を調節する方法。

[15] sc(Fv)₂組成物中の特定の構造異性体の割合を増加させる工程を含む、sc(Fv)₂組成物の活性を増加させる方法。

[16] 以下の工程を含むsc(Fv)₂組成物の活性を増加させる方法。

(a) sc(Fv)₂組成物中の構造異性体を分離する工程

(b) 分離された構造異性体のうち、特定の構造異性体を取得する工程

[17] 以下の工程を含むsc(Fv)₂組成物の活性を増加させる方法。

(a) sc(Fv)₂の構造異性体の活性を比較して高活性の構造異性体をあらかじめ決定する工程

(b) sc(Fv)₂組成物中の構造異性体を分離する工程

(c) 工程(a)により決定された高活性の構造異性体を取得する工程

[18]以下の工程を含むsc(Fv)₂組成物の活性を増加させる方法。

(a) sc(Fv)₂組成物をイオン交換カラムにかける工程

(b) 特定の構造異性体を除去する工程

[19]構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である[14]～[18]のいずれかに記載の方法。

[20]sc(Fv)₂組成物を加熱する工程を含む、sc(Fv)₂組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法。

[21]構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である[20]に記載の方法。

[22]sc(Fv)₂組成物を15℃～50℃でインキュベートする工程を含む、sc(Fv)₂組成物中のsingle chain diabody型の含有割合を増加させる方法。

[23]sc(Fv)₂の重鎖可変領域と軽鎖可変領域が界面を形成しているアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含むsc(Fv)₂組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法。

[24]以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)₂組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法。

(1) sc(Fv)₂の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域の39位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)₂の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における38位に相当するアミノ酸残基

[25]以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)₂組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法。

(1) sc(Fv)₂の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

[26]以下の(1)および(2)のいずれか一方のアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

[27] sc(Fv)2の重鎖可変領域と軽鎖可変領域が界面を形成しているアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含むsc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法。

[28]以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域の39位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における38位に相当するアミノ酸残基

[29]以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の活性を増加させる方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

[30]以下の(1)および(2)のいずれか一方のアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

[31] sc(Fv)2の重鎖可変領域と軽鎖可変領域が界面を形成しているアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含むsc(Fv)2組成物中の構造異性体の異性化反応を抑制する方法。

[32] 以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の異性化反応を抑制する方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域の39位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における38位に相当するアミノ酸残基

[33] 以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の異性化反応を抑制する方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

[34] 以下の(1)および(2)のいずれか一方のアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の異性化反応を抑制する方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

[35] sc(Fv)2のリンカーの長さを調節する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の割合を調節する方法。

[36] 構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である[35]に記載の方法。

[37] sc(Fv)₂の両端のリンカーを0～12アミノ酸、中央のリンカーを10～30アミノ酸に調節する工程を含む、sc(Fv)₂組成物中のsingle chain diabody型の割合を増加させる方法。

[38] sc(Fv)₂の両端のリンカーを12～30アミノ酸、中央のリンカーを0～10アミノ酸に調節する工程を含む、sc(Fv)₂組成物中のbivalent scFv型の割合を増加させる方法。

[39] sc(Fv)₂の両端のリンカーを0～12アミノ酸、中央のリンカーを0～10アミノ酸に調節する工程を含む、single chain diabody型の含有割合が80%以上であるsc(Fv)₂組成物を製造する方法。

[40] sc(Fv)₂の両端のリンカーを12～30アミノ酸、中央のリンカーを0～10アミノ酸に調節する工程を含む、bivalent scFv型の含有割合が80%以上であるsc(Fv)₂組成物を製造する方法。

[41] sc(Fv)₂のリンカー又はリンカー近傍領域を切断する工程を含む、sc(Fv)₂組成物中の構造異性体を分析する方法。

[42] 酵素で処理することによりリンカー又はリンカー近傍領域を切断することを特徴とする[41]に記載の方法。

[43] 構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である[41]または[42]に記載の方法。

[44] 以下の工程を含む、sc(Fv)₂組成物中の構造異性体を分析する方法。

(a) sc(Fv)₂組成物を酵素で処理する工程

(b) 処理後の生成物の分子量または構造を測定する工程

図面の簡単な説明

[0019] [図1](a) VB22B sc(Fv)₂のVH1-linker-VL1-linker-VH2-linker-VL2構造を示す図である。(b) VH1-linker-VL1-linker-VH2-linker-VL2構造の2種類の構造異性体を示す図である。VH1/VL1とVH2/VL2がそれぞれ会合したbivalent scFv構造(左)と、VH1/VL2とVH2/VL1がそれぞれ会合したsingle chain diabody構造(右)を示す。

[図2] peak1とpeak2の陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離の結果を示す図である

。

[図3] peak1、peak2、VB22B sc(Fv)2のsubtilisin処理前後の還元SDS-PAGEの結果を示す写真である。得られたバンドの推定構造を右に示した。

[図4] bivalent scFvとsingle chain antibodyの構造の違いにより生じるsubtilisin限定分解後の分解パターンの違いを示す図である。Bivalent scFv構造の場合、点線で囲った低分子量断片が生じる。

[図5] Subtilisinによるpeak1、peak2、VB22B sc(Fv)2の限定分解後のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す図である。矢印により低分子量ピークの溶出位置を示した。

[図6] VB22B sc(Fv)2構造異性体のTPO様アゴニスト活性評価の結果を示す図である

。

[図7] peak1とpeak2の陽イオン交換クロマトグラフィーによる分離の結果を示す図である

。

[図8] 陽イオン交換クロマトグラフィーより分離したpeak1とpeak2のペプチドマッピングを示す図である。

[図9] peak1、peak2、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のsubtilisin処理後の還元SDS-PAGEの結果を示す写真及び図である。得られたバンドの構造を右に示した。

[図10] Subtilisinによるpeak1、peak2、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の限定分解後のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す図である。矢印により低分子量ピークの溶出位置を示した。

[図11] hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2構造異性体のTPO様アゴニスト活性評価の結果を示す図である。

[図12] 各リンカー改変体のコンストラクトを示す図である。Gxxは中央のリンカー長がxであり、Lxxは両端のリンカー長がxxであり、それぞれリンカーとして(GGGGS (配列番号: 11))_n配列を用いたコンストラクトである。L8は両端のリンカー長が8であり、GGGGSGGS配列 (配列番号: 20) を用いたコンストラクトである。L12は両端のリンカー長が12であり、GGGGSGGGSGGS配列 (配列番号: 21) を用いたコンストラクトである。Pxxはリンカーとして(GGPGS (配列番号: 17))_n配列を用いて中央のリンカー長をxxにしたコンストラクトである。

[図13]各リンカー改変体の陰イオン交換クロマトグラフィー分析結果と構造異性体の得られた存在比率を示す図である。bivalent scFv型構造のパーセントにより示した。

[図14]hydroxyapatiteカラムのクロマトグラムと精製画分のゲルろ過クロマトグラフィー分析の結果を示す図である。

[図15]SOURCE 15Sカラムのクロマトグラムの分析結果を示す図である。

[図16]陽イオン交換クロマトグラフィーの分析結果を示す図である。

[図17]大量精製したhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak1とhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak2のSDS-PAGEの分析結果を示す写真である。

[図18]大量精製したhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak1とhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak2のゲルろ過分析結果を示す図である。

[図19]u2-wz4、改変体v1、改変体v3のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す図である。

[図20]u2-wz4、改変体v1、改変体v3の陽イオン交換クロマトグラフィーの結果を示す図である。

[図21]u2-wz4、u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3の等電点電気泳動の結果を示す写真である。

[図22]u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3のプロテアーゼ限定分解後のゲルろ過クロマトグラフィー分析の結果を示す図である。

[図23]u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3のTPO様アゴニスト活性評価の結果を示す図である。

[図24]u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3のDSC分析の結果を示す図である。

[図25]u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3の熱加速試験におけるゲルろ過クロマトグラフィー分析の結果を示す図である。

[図26]u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3の熱加速試験における陽イオン交換クロマトグラフィー分析の結果を示す図である。

[図27]ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2のpeak1とpeak2の陽イオン交換クロマトグラフィーによる分離の結果を示す図である。

[図28]精製したヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2のpeak1とpeak2の陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析結果を示す図である。

[図29]ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2のpeak1とpeak2のsubtilisin処理後の還元SDS-PAGEの結果を示す写真である。得られたバンドの推定構造を右に示した。

[図30]Subtilisinによるヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2のpeak1とpeak2の限定分解後のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す図である。矢印により低分子量ピークの溶出位置を示した。

[図31]ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2のpeak1とpeak2のBaF3/gp130におけるIL-6中和活性評価の結果を示す図である。

[図32]VB22B sc(Fv)2のpeak1を20mM sodium acetate, 150mM NaCl, pH6.0, 40℃でインキュベートした試料の陰イオン交換クロマトグラフィー分析し経時的にpeak2が増加することを示した図である。

[図33]VB22B sc(Fv)2のpeak1、peak2、及び、40℃で6日間incubateした試料のアゴニスト活性を評価し、peak1がpeak2に異性化することによって活性が増加することを確認した図である。

[図34]hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のpeak1を25℃で10日間、各条件下でincubateすることによるpeak2への異性化を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0020] 本発明者らは、sc(Fv)2の構造異性体を解析する過程で、構造異性体間の活性に差が生じることを見出した。さらに、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の割合を調節できること、また、sc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体を分離取得できることを見出した。本発明は、これら知見に基づくものである。

[0021] 本発明は、sc(Fv)2組成物中の構造異性体を分離し、分離された構造異性体のうち、特定の構造異性体を取得する工程を含む、医薬組成物の製造方法を提供する。

[0022] 本発明においてsc(Fv)2は、4つ以上の抗体可変領域をリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である。例えば、[可変領域1](リンカー1)[可変領域2](リンカー2)[可変領域3](リンカー3)[可変領域4]の順に並んでいることを特徴とする抗体が挙げられる。

- [0023] また、通常、sc(Fv)2は2つのVLと2つのVHの4つの可変領域をリンカーなどで結合して一本鎖にした抗体である(Hudson et al, J Immunol. Methods 1999;231:177-189)。この2つのVHとVLは異なるモノクローナル抗体由来であってもよい。
- [0024] sc(Fv)2は、当業者に公知の方法で作製することができ、例えば、scFvをリンカーで結ぶことによって作製できる。scFvには、抗体のVHおよびVLが含まれ、これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する(scFvの総説については、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』Vol.113(Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp.269-315, 1994)を参照)。
- [0025] また、本発明のsc(Fv)2としては、2つのVH及び2つのVLが、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点としてVH、VL、VH、VL([VH]リンカー[VL]リンカー[VH]リンカー[VL])の順に並んでいることを特徴とする抗体が挙げられるが、2つのVHと2つのVLの順序は特に上記配置に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。例えば以下のような、配置も挙げることができる。
- [VL]リンカー[VH]リンカー[VH]リンカー[VL]
[VH]リンカー[VL]リンカー[VL]リンカー[VH]
[VH]リンカー[VH]リンカー[VL]リンカー[VL]
[VL]リンカー[VL]リンカー[VH]リンカー[VH]
[VL]リンカー[VH]リンカー[VL]リンカー[VH]
- [0026] 本発明のsc(Fv)2は抗体可変領域、リンカー以外のアミノ酸配列を含んでいてもよい。
- [0027] 本発明で用いられる抗体の可変領域は、可変領域の全長でもよいが、抗原への結合活性を維持する限り可変領域の部分配列でもよい。又、可変領域中のアミノ酸配列を置換、欠失、付加、挿入などがされていてもよい。例えば、抗原性を低下させるために、キメラ化やヒト化されていてもよい。
- [0028] また本発明のsc(Fv)2は、そのN末端あるいはC末端にIgGのFc部分等の別のタンパク質を融合してもよい(Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281)。融合するタンパク質は当業者が適宜選択することができる。また本発明のsc(Fv)2は、Fcの各hingeのN末端に2つのscFvを結合させ、中央のリンカー(リンカー2)として抗体のFc領

域を用いた(scFv)₂-Fcの形であってもよい(J Immunol Methods. 2005;306(1-2):93-103.)。

また本発明のsc(Fv)₂は、PEG等のキャリアー高分子や抗がん剤等の有機化合物をコンジュゲートしてもよい。また糖鎖付加配列を挿入し、糖鎖を付加してもよい。

[0029] 抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー(例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996参照)に開示されるリンカー等を用いることができるが、本発明においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、好ましい長さは5アミノ酸以上(上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下)であり、特に好ましくは15アミノ酸である。sc(Fv)₂に3つのペプチドリンカーが含まれる場合には、全て同じ長さのペプチドリンカーを用いてもよいし、異なる長さのペプチドリンカーをもちいてもよい。

[0030] 例えば、ペプチドリンカーの場合:

Ser

Gly•Ser

Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Ser(配列番号:9)

Ser•Gly•Gly•Gly(配列番号:10)

Gly•Gly•Gly•Gly•Ser(配列番号:11)

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly(配列番号:12)

Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser(配列番号:13)

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly(配列番号:14)

Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser(配列番号:15)

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly(配列番号:16)

(Gly•Gly•Gly•Gly•Ser(配列番号:11))_n

(Ser•Gly•Gly•Gly•Gly(配列番号:12))_n

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。但し、ペプチドリッカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

- [0031] 合成化学物リンカー(化学架橋剤)は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS³)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(DTSSP)、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ-EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホ-DST)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES)などであり、これらの架橋剤は市販されている。
- [0032] 4つの抗体可変領域を結合する場合には、通常、3つのリンカーが必要となるが、全て同じリンカーを用いてもよいし、異なるリンカーを用いてもよい。
- [0033] 本発明においてsc(Fv)₂組成物とは、sc(Fv)₂の構造異性体を1または複数含有する組成物を指す。
- [0034] sc(Fv)₂組成物は、当業者に周知の方法で作製することができる。例えば、sc(Fv)₂をコードするDNAを挿入したベクターを宿主細胞へ導入し、sc(Fv)₂を発現させ、発現産物を回収することで、sc(Fv)₂組成物を作製できる。
- [0035] 該ベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製)などが好ましいが、市販の種々のベクターを利用することができる。本発明のsc(Fv)₂を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でsc(Fv)₂を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター(プロメガ社製)、大腸菌であればpETベクター(Invitrogen社製)、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター(GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であればpME18Sベクター(Mol Cell Biol. 8:466-47

2(1988))などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 1 1.4-11.11)。

- [0036] 上記宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。sc(Fv)2を発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞(例:ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、真菌細胞(例:酵母、アスペルギルス)、昆虫細胞(例:ドロソフィラS2、スポドプテラSF9)、動物細胞(例:CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞)および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。
- [0037] sc(Fv)2組成物の回収は、本発明のsc(Fv)2が培地に分泌される場合は、培地を回収することで実施できる。また、sc(Fv)2が細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にsc(Fv)2組成物を回収する。
- [0038] 本発明のsc(Fv)2組成物は、sc(Fv)2の構造異性体を1または複数含有する組成物である限り、どのような状態であってもよく、例えば、組換え細胞培養物等のクールドな状態の組成物、精製された状態の組成物等が例示できるが、これらに制限されるものではない。
- [0039] 本発明において構造異性体とは、アミノ酸配列は同一であるが、立体構造(二次構造あるいは三次構造)が異なるタンパク質同士のことをいう。通常、構造異性体同士では化学的、生物学的、又は物理的性質のうち少なくとも1つは異なる。
- [0040] sc(Fv)2における構造異性体としては、例えば、single chain diabody型とbivalent scFv型の構造異性体が存在する。
- [0041] 本発明においてsingle chain diabody型とは、sc(Fv)2が、[可変領域1](リンカー1)[可変領域2](リンカー2)[可変領域3](リンカー3)[可変領域4]の順で並んでいる場合、可変領域1と可変領域4が会合し、かつ可変領域2と可変領域3が会合した状態の構造

を有するsc(Fv)2をいう。

- [0042] また、本発明においてbivalent scFv型とは、可変領域1と可変領域2が会合し、かつ可変領域3と可変領域4が会合した状態の構造を有するsc(Fv)2のことをいう。
- [0043] single chain diabody型、bivalent scFv型としては、例えば図1bに記載の構造を有するsc(Fv)2が挙げられる。sc(Fv)2の構造異性体がsingle chain diabody型またはbivalent scFv型のどちらの構造を有しているかは、後述される構造異性体の同定方法によって確認することができる。また、NMRを用いた解析、結晶構造解析などにより同定することができる。
- [0044] sc(Fv)2組成物中の構造異性体の分離および取得(精製)は、例えば、sc(Fv)2組成物をイオン交換カラムやHydroxyapatiteカラムにかけ、特定の構造異性体を取得あるいは除去することで行うことができるが、これに制限されず、各種クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、キャピラリー等電点電気泳動、透析、再結晶等の当業者に公知の方法により行うことが可能である。
- [0045] クロマトグラフィーとしては、例えばイオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。クロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。
- [0046] イオン交換クロマトグラフィーを用いる場合、使用されるイオン交換カラムの種類は特に制限されず、陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラムのいずれも使用することができ、目的の抗体や構造異性体などにより適宜決定することができる。例えば、SPイオン交換体カラム、Qイオン交換体カラムなどを用いることが可能であるが、これらに限定されるものではない。吸着クロマトグラフィーとしては、Hydroxyapatiteクロマトグラフィーが例示できるが、これに限定されるものではない。
- [0047] 本発明により、これらの精製方法を用い、特定の構造異性体の精製品を取得するこ

ともできる。

[0048] また、本発明の医薬組成物の製造方法は、sc(Fv)2組成物中の構造異性体間で活性に差が生じる場合に、sc(Fv)2の構造異性体の活性を比較して高活性の構造異性体をあらかじめ決定し、sc(Fv)2組成物中の構造異性体から高活性の構造異性体を分離取得することができる。さらに、本発明の医薬組成物の製造方法は、sc(Fv)2組成物中の構造異性体を分離する前に、後述の方法により、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の比率が好ましい値になるようにリンカーの長さを決定し、決定されたリンカー長を有するsc(Fv)2組成物を作製することもできる。また、sc(Fv)2組成物中の構造異性体を分離する前に、リンカーの長さが異なる複数のsc(Fv)2組成物を作製し、後述される構造異性体比率の分析法によって構造異性体比率を分析し、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の比率が好ましい値となるリンカーを有するsc(Fv)2を選択し、選択されたsc(Fv)2のsc(Fv)2組成物を作製することもできる。また後述の方法により、VHとVLが界面を形成するアミノ酸残基を改変することにより、選択されたsc(Fv)2のsc(Fv)2組成物を作製することもできる。

[0049] 本発明において高活性の構造異性体とは、構造異性体間で活性に差が生じる場合、活性が高い構造異性体、好ましくは最も活性の高い構造異性体のことをいう。例えば、2種類の構造異性体が存在する場合、活性の高い方の構造異性体が本発明でいう高活性の構造異性体に該当する。

[0050] 高活性の構造異性体の決定は当業者に公知の方法で行うことができ、例えば、それぞれの構造異性体を単離し、同一の条件下で目的の活性を測定することにより高活性の構造異性体を決定することができる。

[0051] 本発明において活性は、結合活性、中和活性、細胞傷害活性、アゴニスト活性、アンタゴニスト活性、酵素活性など、いかなる活性でもよく、特に限定されないが、生体、組織、細胞、タンパク質、DNA、RNA等に量的及び／又は質的な変化、影響をもたらす活性であることが好ましく、特にアゴニスト活性が好ましい。

[0052] アゴニスト活性とは、受容体などの抗原に抗体が結合することにより、細胞内にシグナルが伝達される等して、何らかの生理的活性の変化を誘導する活性である。生理的活性としては、例えば、増殖活性、生存活性、分化活性、転写活性、膜輸送活性、

結合活性、タンパク質分解活性、リン酸化／脱リン酸化活性、酸化還元活性、転移活性、核酸分解活性、脱水活性、細胞死誘導活性、アポトーシス誘導活性、などを挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

[0053] 本発明において抗原は特に限定されず、どのような抗原でもよい。抗原の例としては、例えば、受容体、癌抗原、MHC抗原、分化抗原、などを挙げることができる。受容体の例としては、例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリン／スレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、TNF受容体ファミリー、Gタンパク質共役型受容体ファミリー、GPIアンカー型受容体ファミリー、チロシンホスファターゼ型受容体ファミリー、接着因子ファミリー、ホルモン受容体ファミリー、等の受容体ファミリーに属する受容体などを挙げることができる。これら受容体ファミリーに属する受容体、及びその特徴に関しては多数の文献が存在し、例えば、Cooke BA., King RJB., van der Molen HJ. ed. *New Comprehensive Biochemistry Vol.18B "Hormones and their Actions Part II"* pp.1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., New York, USA, Patthy L. (1990) *Cell*, 61: 13-14., Ullrich A., et al. (1990) *Cell*, 61: 203-212., Massagui J. (1992) *Cell*, 69: 1067-1070., Miyajima A., et al. (1992) *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 295-331., Taga T. and Kishimoto T. (1992) *FASEB J.*, 7: 3387-3396., Fantl WJ., et al. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453-481., Smith CA., et al. (1994) *Cell*, 76: 959-962., Flower DR. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1422: 207-234., 宮坂昌之監修, 細胞工学別冊ハンドブックシリーズ「接着因子ハンドブック」(1994) (秀潤社, 東京, 日本) 等が挙げられる。

[0054] 上記受容体ファミリーに属する具体的な受容体としては、例えば、ヒト又はマウスエリスロポエチン(EPO)受容体、ヒト又はマウス顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体、ヒト又はマウスロンボポイエチン(TPO)受容体、ヒト又はマウスインスリン受容体、ヒト又はマウスFlt-3リガンド受容体、ヒト又はマウス血小板由来増殖因子(PDGF)受容体、ヒト又はマウスインターフェロン(IFN)- α , β 受容体、ヒト又はマウスレプチン受容体、ヒト又はマウス成長ホルモン(GH)受容体、ヒト又はマウスインターロイキン(IL)-10受容体、ヒト又はマウスインスリン様増殖因子(IGF)-I受容体、ヒト又はマウス白血病抑制因子(LIF)受容体、ヒト又はマウス毛様体神経栄養因子(CNTF)受容体等を

例示することができる(hEPOR: Simon, S. et al. (1990) Blood 76, 31-35.; mEPOR: D' Andrea, AD. Et al. (1989) Cell 57, 277-285.; hG-CSFR: Fukunaga, R. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 8702-8706.; mG-CSFR: Fukunaga, R. et al. (1990) Cell 61, 341-350.; hTPOR: Vigon, I. et al. (1992) 89, 5640-5644.; mTPOR: Skoda, RC. Et al. (1993) 12, 2645-2653.; hInsR: Ullrich, A. et al. (1985) Nature 313, 756-761.; hFlt-3: Small, D. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 459-463.; hPDGFR: Gronwald, RGK. Et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 3435-3439.; hIFN α / β R: Uze, G. et al. (1990) Cell 60, 225-234.及びNovick, D. et al. (1994) Cell 77, 391-400.)。

- [0055] 癌抗原は細胞の悪性化に伴って発現する抗原であり、腫瘍特異性抗原とも呼ばれる。又、細胞が癌化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖も癌抗原となり、特に癌糖鎖抗原と呼ばれる。癌抗原の例としては、例えば、CA19-9、CA15-3、シリアルSSEA-1(SLX)などを挙げる事ができる。
- [0056] MHC抗原には、MHC class I抗原とMHC class II抗原に大別され、MHC class I抗原には、HLA-A,-B,-C,-E,-F,-G,-Hが含まれ、MHC class II抗原には、HLA-DR,-DQ,-DPが含まれる。
- [0057] 分化抗原には、CD1,CD2,CD3,CD4,CD5,CD6,CD7,CD8,CD10,CD11a,CD11b,CD11c,CD13,CD14,CD15s,CD16,CD18,CD19,CD20,CD21,CD23,CD25,CD28,CD29,CD30,CD32,CD33,CD34,CD35,CD38,CD40,CD41a,CD41b,CD42a,CD42b,CD43,CD44,CD45,CD45RO,CD48,CD49a,CD49b,CD49c,CD49d,CD49e,CD49f,CD51,CD54,CD55,CD56,CD57,CD58,CD61,CD62E,CD62L,CD62P,CD64,CD69,CD71,CD73,CD95,CD102,CD106,CD122,CD126,CDw130などが含まれる。
- [0058] 活性の変化を測定する為に用いる検出指標としては、量的及び／又は質的な変化が測定可能である限り使用することができる。例えば、無細胞系(cell free assay)の指標、細胞系(cell-based assay)の指標、組織系の指標、生体系の指標を用いることができる。
- [0059] 無細胞系の指標としては、酵素反応やタンパク質、DNA、RNAの量的及び／又は質的な変化を用いることができる。酵素反応としては、例えば、アミノ酸転移反応、糖

転移反応、脱水反応、脱水素反応、基質切断反応等を用いることができる。また、タンパク質のリン酸化、脱リン酸化、二量化、多量化、分解、乖離等や、DNA、RNAの増幅、切断、伸長を用いることができる。例えばシグナル伝達経路の下流に存在するタンパク質のリン酸化を検出指標とすることができる。

[0060] 細胞系の指標としては、細胞の表現型の変化、例えば、産生物質の量的及び／又は質的变化、増殖活性の変化、細胞数の変化、形態の変化、特性の変化等を用いることができる。産生物質としては、分泌タンパク質、表面抗原、細胞内タンパク質、mRNA等を用いることができる。形態の変化としては、突起形成及び／又は突起の数の変化、偏平度の変化、伸長度／縦横比の変化、細胞の大きさの変化、内部構造の変化、細胞集団としての異形性／均一性、細胞密度の変化等を用いることができる。これらの形態の変化は検鏡下での観察で確認することができる。特性の変化としては、足場依存性、サイトカイン依存応答性、ホルモン依存性、薬剤耐性、細胞運動性、細胞遊走活性、拍動性、細胞内物質の変化等を用いることができる。細胞運動性としては、細胞浸潤活性、細胞遊走活性がある。また、細胞内物質の変化としては例えば、酵素活性、mRNA量、 Ca^{2+} やcAMP等の細胞内情報伝達物質、細胞内タンパク質量等を用いることができる。また、細胞膜受容体の場合には、受容体の刺激によって誘導される細胞の増殖活性の変化を指標とすることができる。

[0061] 組織系の指標としては、使用する組織に応じた機能変化を検出指標とすることができる。生体系の指標としては組織重量変化、血液系の変化、例えば血球細胞数の変化、タンパク質量や、酵素活性、電解質量の変化、また、循環器系の変化、例えば、血圧、心拍数の変化等を用いることができる。

[0062] これらの検出指標を測定する方法としては、特に制限はなく、吸光、発光、発色、蛍光、放射活性、蛍光偏光度、表面プラズモン共鳴シグナル、時間分解蛍光度、質量、吸収スペクトル、光散乱、蛍光共鳴エネルギー移動、等を用いることができる。これらの測定方法は当業者にとっては周知であり、目的に応じて、適宜選択することができる。

[0063] 例えば、吸収スペクトルは一般的に用いられるフォトメータやプレートリーダー等、発光はルミノメータ等、蛍光はフルオロメータ等で測定することができる。質量は質量分

析計を用いて測定することができる。放射活性は、放射線の種類に応じてガンマカウンタなどの測定機器を用いて、蛍光偏光度はBEACON(宝酒造)、表面プラズモン共鳴シグナルはBIACORE、時間分解蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動などはARVOなどにより測定できる。さらに、フローサイトメータなども測定に用いることができる。これらの測定方法は、一つの測定方法で2種以上の検出指標を測定しても良く、簡便であれば、2種以上の測定を同時及び／又は連続して測定することによりさらに多数の検出指標を測定することも可能である。例えば、蛍光と蛍光共鳴エネルギー移動を同時にフルオロメータで測定することができる。

- [0064] 本発明において、アゴニスト活性の測定は当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、実施例に記載のように細胞増殖を指標にアゴニスト活性を測定する方法により判定することが可能である。より具体的には、アゴニスト依存性増殖を示す細胞に、アゴニスト活性を測定したい抗体を添加し、培養する。その後、WST-8のような生細胞数に応じて特定の波長において発色反応を呈する試薬を添加して吸光度を測定し、得られた吸光度を指標にアゴニスト活性を測定することが可能である。
- [0065] アゴニスト依存性増殖を示す細胞も当業者に公知の方法により作製することが可能であり、例えば、抗原が細胞増殖シグナルを発する受容体である場合には、該受容体を発現している細胞を用いればよい。又、抗原が細胞増殖シグナルを出さない受容体である場合には、細胞増殖シグナルを発する受容体の細胞内領域と、細胞増殖シグナルを出さない受容体の細胞外領域からなるキメラ受容体を作製し、該キメラ受容体を細胞で発現させればよい。細胞増殖シグナルを発する受容体の例としては、例えば、G-CSF受容体、mpl、neu、GM-CSF受容体、EPO受容体、c-kit、FLT-3等を挙げることができる。受容体を発現させる細胞としては、例えば、BaF3、NFS60、FDC P-1、FDCP-2、CTLL-2、DA-1、KT-3等を挙げることができる。
- [0066] 本発明においてsc(Fv)2医薬組成物とは、疾患の治療・予防などの為にヒトに投与されることを目的としたsc(Fv)2組成物のことをいう。
- [0067] 本発明の方法によって分離取得されたsc(Fv)2の特定の構造異性体、または、後述の方法により、特定の構造異性体の割合が増加されたsc(Fv)2組成物は、それらに対して不活性な薬学的に許容される担体、媒体等と混和することにより医薬組成物とす

ることができる。すなわち、本発明は、上記方法で分離取得されたsc(Fv)₂の構造異性体、または、特定の構造異性体の割合が増加されたsc(Fv)₂組成物を有効成分として含有する医薬組成物もまた提供するものである。

[0068] 薬学的に許容される担体、媒体としては、例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、防腐剤、界面活性剤(PEG、Tween等)、キレート剤(EDTA等)、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトール等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50)等と併用してもよい。

[0069] また、必要に応じ、マイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる("Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed., 1980等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明に適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 1981, 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98-105; 米国特許第3,773,919号; 欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 1983, 22: 547-556; EP第133,988号)。

[0070] 本発明のsc(Fv)₂医薬組成物は上述の方法に限定されず、当業者に公知の方法により作製することが可能である。

[0071] 患者への投与は経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。また、患者の

年齢、症状によって適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001~100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明はこれらの投与量および投与方法等に制限されるものではない。

- [0072] 本発明では、特定の構造異性体の含有割合が80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上のsc(Fv)2組成物を提供する。より具体的には、single chain diabody型の含有割合が80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上のsc(Fv)2組成物、又はbivalent scFv型の含有割合が80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上のsc(Fv)2組成物を挙げることができる。
- [0073] 本発明において特定の構造異性体の含有割合が80%とは、sc(Fv)2組成物に含まれる全ての構造異性体に対する特定の構造異性体の割合が80%であることを意味する。例えば、sc(Fv)2組成物中にsingle chain diabody型とbivalent scFv型の2種類の構造異性体が存在する場合、single chain diabody型の含有割合が80%とは、single chain diabody型とbivalent scFv型の比率が80:20であることを意味する。
- [0074] 本発明において80%以上、90%以上、95%以上の含有割合の上限は特に限定されないが、100%若しくは100%に近いことが好ましい。100%に近い上限は当業者の精製技術や分析技術に依存するが、例えば、99.999%、99.99%、99.9%、99%などである。構造異性体の含有割合は、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動、キャピラリー等電点電気泳動等を用いて構造異性体を分離することにより、測定することが可能である。
- [0075] また、本発明は、特定の構造異性体の含有割合を80%以上にしたsc(Fv)2組成物を有効成分として含有する、医薬組成物を提供する。sc(Fv)2を医薬組成物として使用する場合、通常、活性は高い方が好ましいので、高活性の構造異性体の含有割合が80%以上のsc(Fv)2組成物を有効成分として含有することが好ましい。例えば、抗Mpl抗体のアゴニスト活性はsingle chain diabody型の方が高いので、Mplに対するsc(Fv)2をアゴニストとして使用する場合には、single chain diabody型の含有割合が80%以上であるsc(Fv)2組成物を有効成分として含有する、医薬組成物であることが好

ましい。

- [0076] 本発明は、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の割合を変化させる工程を含む、sc(Fv)2組成物の活性を調節する方法を提供する。
- [0077] 本発明においては、sc(Fv)2の構造異性体間において活性に著しい差があるという知見を基に、sc(Fv)2組成物に含まれる特定の構造異性体の含有割合を変化させることによりsc(Fv)2組成物の活性を調節することが可能であることを見出した。sc(Fv)2組成物の活性を調節する具体的な方法としては、例えば、sc(Fv)2組成物中に含まれるsingle chain diabody型とbivalent scFv型の割合を変化させることにより、sc(Fv)2組成物の活性を調節することが可能である。
- [0078] また、本発明は、sc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の割合を増加させる工程を含む、sc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法を提供する。上述したsc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体を分離取得する方法を使用することで実施することができる。
- [0079] 例えば、sc(Fv)2組成物中の高活性の構造異性体の割合を高くすることにより、活性が高いsc(Fv)2組成物を製造することが可能であり、逆に、sc(Fv)2組成物中の高活性の構造異性体の割合を低くすることにより、活性を抑えたsc(Fv)2組成物を製造することが可能である。
- [0080] single chain diabody型の活性がbivalent scFv型よりも高い場合、sc(Fv)2組成物中のsingle chain diabody型の含有割合を増加させることにより、sc(Fv)2組成物の活性を増加させることができ、bivalent scFv型の含有割合を増加させることにより、sc(Fv)2組成物の活性を低下させることができる。逆に、bivalent scFv型の活性がsingle chain diabody型よりも高い場合、sc(Fv)2組成物中のbivalent scFv型の含有割合を増加させることにより、sc(Fv)2組成物の活性を増加させることができ、single chain diabody型の含有割合を増加させることにより、sc(Fv)2組成物の活性を低下させることができる。single chain diabody型とbivalent scFv型のどちらが高活性であるかは、目的とする活性に依存するが、当業者は公知の方法により容易に測定することが可能である。
- [0081] sc(Fv)2を医薬組成物として使用する場合、通常、活性は高い方が好ましいことが多いので、sc(Fv)2組成物に含まれる特定の構造異性体の割合を変化させることによ

り、医薬組成物の活性を増加させることが可能である。

- [0082] sc(Fv)2組成物中に含まれる特定の構造異性体の含有割合を増加させ、sc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法は如何なる方法により行われてもよく、例えば、sc(Fv)2組成物を得た後に特定の構造異性体の含有割合を高くしてもよいし、特定の構造異性体の含有割合が高くなるようにsc(Fv)2をコードするDNAを設計してもよい。
- [0083] sc(Fv)2組成物を得た後に特定の構造異性体の割合を高くする具体的な方法としては、例えば、得られたsc(Fv)2組成物から目的の構造異性体を単離(あるいは目的でない構造異性体を除去)する方法を挙げることができる。目的の構造異性体の単離は、上記のように当業者に公知のタンパク質の分離取得方法により行うことが可能である。
- [0084] また、例えば、sc(Fv)2組成物を加熱することにより、特定の構造異性体の含有割合を増加させることもできる。本発明者らは、sc(Fv)2組成物を一定温度でインキュベートすることにより、single chain diabody型の含有割合を増加させることが可能であることを見出している。よって、sc(Fv)2組成物を15℃～50℃、好ましくは20℃～40℃、特に好ましくは25℃～35℃にてインキュベートすることにより、single chain diabody型の含有割合を増加させることが可能である。インキュベートされたsc(Fv)2組成物は、その後、元の温度に戻しても、増加したsingle chain diabody型の含有割合は維持される。
- [0085] 特定の構造異性体の含有割合が高くなるようにsc(Fv)2をコードするDNAを設計する方法としては、例えば、上述のように適切なリンカーの長さになるようにDNAを設計する方法が挙げられる。
- [0086] さらに、sc(Fv)2の可変領域の会合を制御することで、sc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させることも可能である。具体的には、sc(Fv)2の可変領域の界面を形成しているアミノ酸残基を改変すべく、sc(Fv)2をコードするDNAを改変する。
- [0087] 本発明における「会合」とは、例えば、sc(Fv)2の可変領域が相互作用する状態を指すものと換言することができる。
- [0088] 本発明において「会合を制御する」とは、所望の会合状態になるように制御すること

を言い、より具体的には、sc(Fv)2内において望ましくない会合が形成されないように制御することを言う。

[0089] 本発明における「界面」とは、通常、会合(相互作用)する際の会合面を指し、界面を形成するアミノ酸残基とは、通常、その会合に供されるsc(Fv)2の可変領域に含まれる1もしくは複数のアミノ酸残基であって、より好ましくは、会合の際に接近し相互作用に関与するアミノ酸残基を言う。該相互作用には、具体的には、会合の際に接近するアミノ酸残基同士が水素結合、静電的相互作用、塩橋を形成している場合等が含まれる。

[0090] 本発明における「界面を形成するアミノ酸残基」とは、詳述すれば、界面を構成するsc(Fv)2の可変領域において、該可変領域に含まれるアミノ酸残基を言う。

[0091] 本発明の方法におけるアミノ酸残基の「改変」とは、具体的には、元(改変前)のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基へ置換すること、元のアミノ酸残基を欠失させること、新たなアミノ酸残基を付加すること等を指すが、好ましくは、元のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基へ置換することを指す。

[0092] 本発明の上記方法において「DNAを改変する」とは、本発明における「改変」によって導入されるアミノ酸残基に対応するようにDNAを改変することを言う。より具体的には、元のアミノ酸残基をコードするDNAについて、改変によって導入されるアミノ酸残基をコードするDNAへ改変することを言う。通常、目的のアミノ酸残基をコードするコドンとなるように、元のDNAに対して、少なくとも1塩基を挿入、欠失または置換するような遺伝子操作もしくは変異処理を行うことを意味する。即ち、元のアミノ酸残基をコードするコドンは、改変によって導入されるアミノ酸残基をコードするコドンによって置換される。このようなDNAの改変は、当業者においては公知の技術、例えば、部位特異的変異誘発法、PCR変異導入法等を用いて、適宜実施することが可能である。

[0093] 本発明の好ましい態様においては、例えば、sc(Fv)2の可変領域の界面を形成する2残基以上のアミノ酸残基が、同種の電荷となるように該界面にアミノ酸残基の変異を導入する。界面において会合に関与する2以上のアミノ酸残基が互いに同種の電荷となるように改変されることにより、その電荷の反発力によって、これらアミノ酸残基の会合が阻害されるものと考えられる。従って、上記方法において、改変されるアミノ

酸残基は、界面を形成するsc(Fv)2の可変領域間において、会合の際に互いに接近した2以上のアミノ酸残基であることが好ましい。

- [0094] 会合の際に接近するアミノ酸残基は、例えば、sc(Fv)2の立体構造を解析し、該sc(Fv)2の会合の際に界面を形成する可変領域のアミノ酸配列を調べることにより見出すことができる。界面において互いに接近したアミノ酸残基は、本発明の方法における「改変」の好ましいターゲットとなる。
- [0095] アミノ酸の中には、電荷を帯びたアミノ酸が知られている。一般的に正の電荷を帯びたアミノ酸(正電荷アミノ酸)としては、リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)が知られている。負の電荷を帯びたアミノ酸(負電荷アミノ酸)としては、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)等が知られている。従って、好ましくは、本発明において同種の電荷のアミノ酸とは、正の電荷同士のアミノ酸、あるいは負の電荷同士のアミノ酸を言う。
- [0096] 本発明においては、界面を形成するアミノ酸残基が同種の電荷となるように改変されることが好ましく、同種のアミノ酸の中でも、同一のアミノ酸であればさらに好ましい。例えば、改変後のアミノ酸残基は、リジンとアルギニンであってもよいが、2つのリジン、あるいは2つのアルギニンであることがより好ましい。
- [0097] また、改変によって導入されるアミノ酸残基が複数の場合、これらアミノ酸残基の中に電荷を持たないアミノ酸残基が少数程度含まれていてもよい。
- [0098] 本発明の方法において改変に供されるアミノ酸残基の数は、特に制限されないが、抗原との結合活性を低下させないために、なるべく少数のアミノ酸残基を改変することが好ましい。上記「少数」とは、例えば、1～10個程度の数、好ましくは、1～5程度の数、より好ましくは1～3程度の数、最も好ましくは1または2を表す。
- [0099] なお、元のsc(Fv)2において、界面を形成するアミノ酸残基(X)が既に電荷を有する場合、あるいは水素結合を形成している場合、会合の際に該アミノ酸残基と近接し相対するアミノ酸残基を、該アミノ酸残基(X)と同一のアミノ酸残基(もしくは同種の電荷のアミノ酸残基)となるように改変することも本発明の好ましい態様の一つである。この態様においては、界面を形成するアミノ酸残基の一方を改変すればよい。
- [0100] また、本発明の好ましい態様においては、sc(Fv)2の可変領域の界面を形成するア

ミノ酸残基の改変が、界面に存在する疎水性コアを形成するアミノ酸残基が電荷を有するアミノ酸残基となるように、該界面にアミノ酸残基の変異を導入する。

[0101] 一般的に、「疎水性コア (hydrophobic core)」は、会合したポリペプチドの内側に疎水性アミノ酸の側鎖が集合して形成する部分を指す。疎水性アミノ酸は、例えばアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、バリンなどが含まれる。また、疎水性コアの形成には、疎水性アミノ酸以外のアミノ酸残基(例えばチロシン)が関わることもある。この疎水性コアは、親水性アミノ酸の側鎖が外側に露出する親水性表面とともに、水溶性のポリペプチドの会合を進める駆動力となる。異なる2つのドメインの疎水性アミノ酸が分子表面に存在し、水分子に暴露されるとエントロピーが増大し自由エネルギーが増大してしまう。よって、2つのドメインは自由エネルギーを減少させ、安定化するために、互いに会合し、界面の疎水性アミノ酸は分子内部に埋もれ、疎水性コアを形成することになる。

[0102] ポリペプチドの会合の際に、形成された疎水性コアを形成するアミノ酸残基から電荷を持つ極性アミノ酸へ改変することにより、疎水性コアの形成が阻害され、その結果、ポリペプチドの会合が阻害されるものと考えられる。ポリペプチドであるsc(Fv)₂も同様に、可変領域の会合により疎水性コアが形成される。よって、この疎水性コアのアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸に置換することにより、可変領域の会合を制御できるものと考えられる。

[0103] 当業者においては、所望のsc(Fv)₂についてアミノ酸配列を解析することにより、疎水コアの存在の有無、および形成部位(領域)等を知ることが可能である。

[0104] また、可変領域の界面を形成しているアミノ酸残基において、望ましい会合を促進するためにknobs-into-holes (特表2001-523971)技術を利用することも考えられる。knobs-into-holesは、ヘテロマルチマー形成を促進し、ホモマルチマー形成を抑制するように、第一のポリペプチドの界面と第二のポリペプチドの界面で特異的かつ相補的な相互作用を導入する(例えば、非天然のジスルフィド結合が第一のポリペプチドと第二のポリペプチド間に形成されるように、第一のポリペプチドの界面に遊離チオール含有残基を、第二のポリペプチドの界面中に相当する遊離チオール含有残基を導入する)方法であるが、本発明に利用することができる。knobs-into-holesは当業

者に公知の技術であり、当業者は適宜、sc(Fv)2に導入することが可能である。さらに、上記技術を組み合わせて利用することもできる。

- [0105] 可変領域は、通常3つのCDR領域と4つのFR領域によって構成されている。本発明の好ましい態様において「改変」に供するアミノ酸残基としては、例えば、CDR領域あるいはFR領域に位置するアミノ酸残基の中から適宜選択することができる。一般的にCDR領域のアミノ酸残基の改変は、抗原に対する結合能を低下させる場合がある。従って、本発明において「改変」に供するアミノ酸残基としては、特に限定されるものではないが、FR領域に位置するアミノ酸残基の中から適宜選択することが好ましい。
- [0106] 当業者であれば、本発明の方法によって会合を制御したい所望のsc(Fv)2について、会合した際のFRの界面において接近するアミノ酸残基の種類を適宜知ることが可能である。
- [0107] 例えば、会合した際のFRの界面において接近するアミノ酸残基の具体例として、VH上の39位(FR2領域)のグルタミン(Q)と、相対(接触)するVL上の38位の(FR2領域)のグルタミン(Q)を挙げることができる。さらに、VH上の45位(FR2)のロイシン(L)と、相対するVL上の44位の(FR2)のプロリン(P)を好適に例示することができる。なお、これら部位のナンバリングについては、Kabatらの方法(Kabat EA et al. 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH)を参考にしている。
- [0108] これらアミノ酸残基は、ヒトおよびマウスにおいて高度に保存されていることが知られている(J. Mol. Recognit. 2003; 16: 113-120)ことから、実施例に示すsc(Fv)2以外のsc(Fv)2についても、上記アミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を改変することによって、sc(Fv)2の可変領域の会合を制御することができる。
- [0109] [可変領域1](リンカー1)[可変領域2](リンカー2)[可変領域3](リンカー3)[可変領域4]の順で並んでいるsc(Fv)2において、single chain diabody型の含有割合を増加させる方法を例示する。
- [0110] 該sc(Fv)2において、bivalent scFv型が生じる場合は、可変領域1と可変領域2の会合および可変領域3と可変領域4の会合を抑制し、かつ、可変領域1と可変領域4の会合および可変領域2と可変領域3の会合を抑制しないように(あるいは促進するように)、可変領域の界面を形成しているアミノ酸残基に置換変異を導入する。

- [0111] 該sc(Fv)2において、可変領域1と可変領域3が会合し、かつ可変領域2と可変領域4が会合した状態の構造を有する構造異性体が生じる場合は、これらの会合を抑制し、かつ、可変領域1と可変領域4の会合および可変領域2と可変領域3の会合を抑制しないように(あるいは促進するように)、可変領域の界面を形成しているアミノ酸残基に置換変異を導入する。
- [0112] 該sc(Fv)2において、可変領域1と可変領域3が会合した状態の構造を有する構造異性体が生じる場合は、この会合を抑制し、かつ、可変領域1と可変領域4の会合および可変領域2と可変領域3の会合を抑制しないように(あるいは促進するように)、可変領域の界面を形成しているアミノ酸残基に置換変異を導入する。
- [0113] 該sc(Fv)2において、可変領域2と可変領域4が会合した状態の構造を有する構造異性体が生じる場合は、この会合を抑制し、かつ、可変領域1と可変領域4の会合および可変領域2と可変領域3の会合を抑制しないように(あるいは促進するように)、可変領域の界面を形成しているアミノ酸残基に置換変異を導入する。
- [0114] また、[可変領域1](リンカー1)[可変領域2](リンカー2)[可変領域3](リンカー3)[可変領域4]の順で並んでいるsc(Fv)2において、bivalent scFv型の含有割合を増加させる方法を例示する。
- [0115] 該sc(Fv)2において、single chain diabody型が生じる場合は、可変領域1と可変領域4の会合および可変領域2と可変領域3の会合を抑制し、かつ、可変領域1と可変領域2の会合および可変領域3と可変領域4の会合を抑制しないように(あるいは促進するように)、可変領域の界面を形成しているアミノ酸残基に置換変異を導入する。
- [0116] 該sc(Fv)2において、可変領域1と可変領域3が会合し、かつ可変領域2と可変領域4が会合した状態の構造を有する構造異性体が生じる場合は、これらの会合を抑制し、かつ、可変領域1と可変領域2の会合および可変領域3と可変領域4の会合を抑制しないように(あるいは促進するように)、可変領域の界面を形成しているアミノ酸残基に置換変異を導入する。
- [0117] 該sc(Fv)2において、可変領域1と可変領域3が会合した状態の構造を有する構造異性体が生じる場合は、この会合を抑制し、かつ、可変領域1と可変領域2の会合および可変領域3と可変領域4の会合を抑制しないように(あるいは促進するように)、可

変領域の界面を形成しているアミノ酸残基に置換変異を導入する。

[0118] 該sc(Fv)2において、可変領域2と可変領域4が会合した状態の構造を有する構造異性体が生じる場合は、この会合を抑制し、かつ、可変領域1と可変領域2の会合および可変領域3と可変領域4の会合を抑制しないように(あるいは促進するように)、可変領域の界面を形成しているアミノ酸残基に置換変異を導入する。

[0119] 以下に、より詳細な例を示すが、これに限定されるものではない。

[0120] 例えば、[VH1]リンカー[VL2]リンカー[VH3]リンカー[VL4]の順に並んでいるsc(Fv)2において、bivalent scFv型の割合を減少させて、single chain diabody型の割合を増加させるには、例えば、VH1とVL2の界面を形成しているアミノ酸残基を同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換し、VH3とVL4の界面を形成しているアミノ酸残基を同種の電荷を有するアミノ酸残基であって、VH1とVL2に導入したアミノ酸残基と反発しない電荷(好ましくは親和性のある電荷)を有するアミノ酸残基に置換する。また、例えば、VH1とVL2の界面を形成しているアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(knob; 突起)に置換し、VH3とVL4の界面を形成しているアミノ酸側鎖をより小さい側鎖(hole; 空隙)に置換する。このような置換により、VH1とVL2の会合およびVH3とVL4の会合を抑制し、かつ、VH1とVL4の会合およびVL2とVH3の会合を抑制しないように(あるいは促進するように)制御できる。

[0121] また、[VH1]リンカー[VL2]リンカー[VH3]リンカー[VL4]の順に並んでいるsc(Fv)2において、single chain diabody型の割合を減少させて、bivalent scFv型の割合を増加させるには、例えば、VH1とVL4の界面を形成しているアミノ酸残基を同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換し、VH3とVL2の界面を形成しているアミノ酸残基を同種の電荷を有するアミノ酸残基であって、VH1とVL4に導入したアミノ酸残基と反発しない電荷(好ましくは親和性のある電荷)を有するアミノ酸残基に置換する。また、例えば、VH1とVL4の界面を形成しているアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(knob; 突起)に置換し、VH3とVL2の界面を形成しているアミノ酸側鎖をより小さい側鎖(hole; 空隙)に置換する。このような置換により、VH1とVL4の会合およびVH3とVL2の会合を抑制し、かつ、VH1とVL2の会合およびVH3とVL4の会合を抑制しないように(あるいは促進するように)制御できる。

[0122] 本発明の好ましい態様において、以下の(1)および(2)、または(3)および(4)のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)₂組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法を提供する。

(1) sc(Fv)₂のVHに含まれるアミノ酸残基であって、重鎖のアミノ酸配列における39位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)₂のVLに含まれるアミノ酸残基であって、重鎖のアミノ酸配列における38位に相当するアミノ酸残基

(3) sc(Fv)₂のVHに含まれるアミノ酸残基であって、重鎖のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(4) sc(Fv)₂のVLに含まれるアミノ酸残基であって、重鎖のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

[0123] さらに本発明は、以下の(1)および(2)のいずれか一方のアミノ酸残基、または(3)および(4)のいずれか一方のアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)₂組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法を提供する。

(1) sc(Fv)₂のVHに含まれるアミノ酸残基であって、重鎖のアミノ酸配列における39位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)₂のVLに含まれるアミノ酸残基であって、重鎖のアミノ酸配列における38位に相当するアミノ酸残基

(3) sc(Fv)₂のVHに含まれるアミノ酸残基であって、重鎖のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(4) sc(Fv)₂のVLに含まれるアミノ酸残基であって、重鎖のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

[0124] 上記(1)～(4)に記載のアミノ酸残基は、通常、ヒトおよびマウスにおいては、それぞれ、(1)グルタミン(Q)、(2)グルタミン(Q)、(3)ロイシン(L)、(4)プロリン(P)であるが、必ずしもこのアミノ酸残基に限定されず、このアミノ酸に相当する他のアミノ酸であってもよい。例えば、VL上のアミノ酸配列における38位に相当するアミノ酸として、ヒトの場合、例えば、ヒスチジン(H)であってもよい。当業者においては、公知文献等(例え

ば、J. Mol. Recognit. 2003; 16: 113-120)を参照することにより、任意の位置について、その位置に相当するアミノ酸残基の種類を知ることが可能である。

sc(Fv)₂の重鎖可変領域と軽鎖可変領域が界面を形成しているアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換することで、sc(Fv)₂組成物中の後述される構造異性体の異性化反応を抑制することもできる。本発明は、sc(Fv)₂の重鎖可変領域と軽鎖可変領域が界面を形成しているアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含むsc(Fv)₂組成物中の構造異性体の異性化反応を抑制する方法もまた提供するものである。sc(Fv)₂の重鎖可変領域と軽鎖可変領域が界面を形成しているアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程の具体的な態様は上述の通りである。

[0125] 本発明はsc(Fv)₂の両端のリンカー又は／及び中央のリンカーの長さを調節することにより、sc(Fv)₂組成物中の構造異性体の割合を調節する方法を提供する。本発明において両端のリンカーとは、sc(Fv)₂が[可変領域1](リンカー1)[可変領域2](リンカー2)[可変領域3](リンカー3)[可変領域4]の順で並んでいる場合、リンカー1とリンカー3が両端のリンカーとなり、リンカー2が中央のリンカーとなる。

[0126] 具体的には、両端のリンカーを0～12アミノ酸とし、中央のリンカーを10～30アミノ酸とすることにより、sc(Fv)₂組成物中のsingle chain diabody型の比率を増加することが可能となり、両端のリンカーを12～30アミノ酸とし、中央のリンカーを0～10アミノ酸とすることにより、sc(Fv)₂組成物中のbivalent scFv型の比率を増加させることが可能となる。

[0127] さらに、本発明は両端のリンカー又は／及び中央のリンカーの長さを調節することにより、single chain diabody型の含有比率が80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上のsc(Fv)₂組成物を製造する方法を提供する。さらに、本発明は、両端のリンカー又は／及び中央のリンカーの長さを調節することにより、bivalent scFv型の含有比率が80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上のsc(Fv)₂組成物を製造する方法を提供する。

[0128] 具体的には、両端のリンカーを0～12アミノ酸とし、中央のリンカーを0～10アミノ酸とすることにより、single chain diabody型の含有比率が80%以上のsc(Fv)₂組成物を製

造することが可能であり、両端のリンカーを12～30アミノ酸とし、中央のリンカーを0～10アミノ酸とすることにより、bivalent scFv型の含有比率が80%以上のsc(Fv)2組成物を製造することが可能となる。

- [0129] さらに、本発明は、sc(Fv)2のリンカー部位を切断する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の構造を同定する方法を提供する。
- [0130] 本発明においてリンカー部位とは、リンカーおよびリンカー近傍領域を含んだ部位のことをいう。リンカー近傍領域とは、リンカーに隣接したアミノ酸から、該アミノ酸から可変領域側に20番目のアミノ酸までの20アミノ酸からなる領域のことをいう。従って、リンカー部位は、リンカーの両端にそれぞれ20アミノ酸からなる領域が付加された部位となる。
- [0131] この方法は、クロマトグラフィー等によるsingle chain diabody型、bivalent scFv型の解析方法に比較して、より簡便な方法である。クロマトグラフィーでは構造異性体の分離が出来ても、分離されたsc(Fv)2の構造の同定を行うことは出来ない。この方法によりクロマトグラフィー等で分離された構造異性体の構造を同定することが可能である。
- [0132] single chain diabody型とbivalent scFv型で立体構造が違うことから、酵素などにより3つのリンカー部位のうちいずれか1つのリンカー部位が切断された場合、single chain diabody型とbivalent scFv型では切断後の生成物に違いがある。
- [0133] 具体的には、sc(Fv)2が[可変領域1](リンカー1)[可変領域2](リンカー2)[可変領域3](リンカー3)[可変領域4]の順で並んでいる場合、bivalent scFv型では、リンカー1または3の部位で切断されると、4つの可変領域は共有結合又は非共有結合で結合しているため、2つのscFvに分離することはないが、リンカー2の部位で切断された場合、可変領域1と2からなるscFvと可変領域3と4からなるscFvの2つのscFvに分離される。single chain diabody型ではリンカー1、2または3のいずれのリンカー部位で切断された場合でも4つの可変領域は共有結合又は非共有結合に結合しているため、2つのscFvに分離することはない(図4参照)。
- [0134] 従って、bivalent scFv型では3つのリンカー部位のうちいずれか1つのリンカー部位を切断した場合、4つの可変領域を含む生成物と2つの可変領域を含む生成物の2

種類が生成されるが、single chain diabody型では3つのリンカー部位のうちいずれか1つのリンカー部位を切断した場合、4つの可変領域を含む生成物のみが生成される。

[0135] 以上のように、sc(Fv)のリンカー部位のうちの1つを酵素などで切断し、切断後の生成物を比較することにより、sc(Fv)₂がsingle chain diabody型、bivalent scFv型のいずれであるかを調べる事が可能である。従って、本発明は、sc(Fv)のリンカー部位を切断する工程を含む、sc(Fv)₂組成物中の構造異性体の型を分析する方法を提供する。

[0136] 具体的には、

- (a) sc(Fv)₂組成物中のsc(Fv)のリンカー部位を切断する工程、
 - (b) 切断後の生成物の分子量または構造を測定する工程、
- を含む方法である。

[0137] 一般にsc(Fv)₂のリンカー部分は、高次構造を取っていないため、プロテアーゼ等の分解を受けやすいことが知られている (Hoedemaeker et al, J Biol Chem. 1997; 272 : 29784-29789)。リンカーを切断する方法は特に限定されないが、酵素による切断が好ましく、特にプロテアーゼによる切断が好ましい。使用されるプロテアーゼは特に限定されず、エキソペプチダーゼ、エンドペプチダーゼのいずれでもよいが、リンカーを切断するという目的からエンドペプチダーゼが好ましい。エンドペプチダーゼは、セリンプロテアーゼ、チオールペプチダーゼ、酸性プロテアーゼ、メタロプロテアーゼなど如何なるものでもよく、当業者であれば、リンカーの種類やアミノ酸配列に応じて適宜選択することが可能である。例えば、セリンプロテアーゼとして、Arg, Lys残基のC末端側を特異的に加水分解するトリプシンやタンパク質・ペプチドを非特異的に加水分解するサブチリシンなどが挙げられる。また、チオールプロテアーゼとして、タンパク質・ペプチドのN末端のpGlu残基を特異的に加水分解するピログルタメートアミノペプチダーゼやタンパク質・ペプチドを非特異的に加水分解するパパイニンなどが挙げられる。

[0138] 切断されるリンカーの数は限定されるものではないが、1つであることが好ましい。リンカーを1つ切断する場合の条件は当業者に公知の方法で決定することができる。

[0139] 又、切断後の生成物の分子量または構造の測定は、可変領域間の非共有結合を

維持したまま測定することが好ましく、例えば、native pageやゲルろ過などを用いることが可能である。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0140] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[0141] [実施例1] VB22B sc(Fv)2の構造異性体の分離、構造決定、および活性評価

1-1. 抗ヒトMpl抗体VB22B sc(Fv)2の作製

抗ヒトMpl抗体VB22B sc(Fv)2は、PCT/JP2004/18506(国際公開WO2005/56604)に示す通りに作製した。具体的には、抗ヒトMpl抗体を産生するマウスハイブリドーマVB22Bの抗体可変領域cDNAをクローニングし、リンカー配列(GlyGlyGlyGlySer)_{x3}(配列番号:1)をコードする塩基配列およびFLAG配列(AspTyrLysAspAspAspAspLys)(配列番号:2)をコードする塩基配列を用いて、VH-リンカー配列-VL-リンカー配列-VH-リンカー配列-VL-Flagタグ配列で構成される塩基配列(配列番号:3)を持つようなDNAを作製した。このDNA断片を発現ベクターpCXND3にクローニングしてVB22B sc(Fv)2発現ベクターを構築し、CHO-DG44細胞に遺伝子導入することで、安定発現細胞株を作製した。具体的には、発現ベクター(25 μ g)とPBSに懸濁したCHO-DG44細胞(1×10^7 細胞/mL)の0.75mLを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後にGene PulserII(BioRad)を用いて1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、500 μ g/mL Geneticin(Invitrogen)を含むCHO-S-SFMII培地(Invitrogen)に加えて選抜し、VB22B sc(Fv)2産生CHO細胞株を樹立した。

[0142] 続いて、この細胞株より培養上清を20mM リン酸緩衝液(pH6.8)で平衡化したMacro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type I(Bio-Rad)カラムにかけ、250mM リン酸緩衝液(pH6.8)で段階的に溶出した。溶出画分は、限外ろ過膜を用いて濃縮後、HiLoad 26/60 Superdex200pgカラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、分子量が約70kD~40kDに相当する画分を分取した。この画分を、50mM Tris-HCl(pH7.4)、150

mM NaCl, 0.05% Tween20で平衡化したAnti-Flag M2 Affinity Gel (SIGMA-ALDRICH) カラムに吸着させ、100 mM Glycine-HCl(pH 3.5)で溶出させた。溶出面分は、直ちに1M Tris-HCl (pH8.0)で中和を行い、HiLoad 26/60 Superdex200pg (Amersham-Bioscience)カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーのバッファーは、20 mM酢酸 (pH6.0), 150 mM NaCl, 0.01% Tween 80を使用した。

[0143] 1-2. VB22B sc(Fv)2の構造異性体の分離

VB22B sc(Fv)2は VH_1 -linker- VL_2 -linker- VH_3 -linker- VL_4 の配列を有するsc(Fv)2であることから、Fv(VH , VL 間で非共有結合した分子)の組み合わせにより、構造は VH_1 と VL_2 、 VH_3 と VL_4 がそれぞれFvを形成するbivalent scFv型と、 VH_1 と VL_4 、 VH_2 と VL_3 がそれぞれFvを形成するsingle chain diabody型の2種類の構造異性体が存在すると考えられる(図1)。VB22B sc(Fv)2の構造異性体の分離を検討した結果、下記の溶離条件下で陰イオン交換クロマトグラフィー-MONO Q (Amersham Bioscience)を用いることによりVB22B sc(Fv)2の各種構造異性体の分離に成功した。

<溶離条件>

移動相A : 20mM Tris-HCl, pH8.0

移動相B : 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH8.0

流速 : 1.0ml/min

グラジエント : B0%→B35%(30min)

[0144] 上記条件により、VB22B sc(Fv)2は4つのピークに分離した。図2に示すようなクロマトグラムが得られ、保持時間の短いピークからそれぞれ、pre peak1、pre peak2、peak 1、peak2と命名した。

[0145] peak1及びpeak2に関して、Q-TOF型質量分析計(Q ToF Ultima, Micro Mass)に、Infusionにて試料溶液を導入し得られた多価イオンスペクトル(+)を付属ソフト(MassLynx)を用いたデコンボリューションを行った結果、それぞれの分子量はpeak1;54115Da、peak2;54112Daであったことから、peak1とpeak2は同一の分子量を有することが分かった。

[0146] VB22B sc(Fv)2は糖鎖付加がないこと、またpeak1とpeak2は同一のアミノ酸一次配

列を持ち、且つ、イオン交換クロマトグラフィーで分離される互いに異なる立体構造を有することから、peak1とpeak2は構造異性体(conformational isomer)であることが示唆された。公知文献では、構造異性体の存在は示唆されていたが、本検討により初めて構造異性体を分離することが可能になった。

[0147] 1-3. VB22B sc(Fv)2の構造異性体の構造決定

VB22B sc(Fv)2は VH_1 -linker- VL_2 -linker- VH_3 -linker- VL_4 の配列を有するsc(Fv)2であることから、Fv(VH , VL 間で非共有結合した分子)の組み合わせにより、 VH_1 と VL_2 、 VH_3 と VL_4 がそれぞれFvを形成するbivalent scFv型、 VH_1 と VL_4 、 VH_2 と VL_3 がそれぞれFvを形成するsingle chain diabody型の2種類の構造異性体が存在すると予想されることから、peak1とpeak2はこれらの構造異性体であると考えられた。

[0148] 本検討により2種類の構造異性体を同定する分析法として、プロテアーゼ限定分解法を見出した。sc(Fv)2のリンカー部分は、比較的自由的な構造を取っていると考えられ、プロテアーゼに対する耐性が低いと考えられ、プロテアーゼの一種であるsubtilisin Aを用いて、以下の条件でpeak1及びpeak2及びVB22B bulk (peak1 : peak2 ~ 1 : 3)と反応させた。

〈反応条件〉

20mM sodium citrate, 150mM NaCl, pH7.5

VB22B sc(Fv)2 peak1 or peak2 : 0.14mg/mL

Subtilisin A : 1ug/mL

37°C, 30min

[0149] 上記の反応後、TrisGlycine SDS gel 12%を用いて、還元SDS-PAGEを行った。その結果、VB22B bulk (構造異性体分離前)、peak1、peak2はいずれも同様のバンドパターンを示した(図3)。VB22B sc(Fv)2の3箇所のリンカー部分の切断によると思われる各断片の特異的なバンドが得られたことから、上記反応条件を用いることで、VB22B sc(Fv)2のリンカー部分を部分的且つ限定的に分解できることが判明した。

[0150] 2種類の構造異性体において、3箇所のリンカーの中で1箇所の切断が起こった場合、図4に示すように、未変性状態では VH と VL の間の非共有的な結合によりsingle chain diabody型の構造においては、3箇所のリンカーの中でどのリンカーに切断が起

こつても見かけの分子量には変化が見られないが、bivalent scFv型においては、中央のリンカーに切断が起こった場合、半分の分子量の分子種が生成する。そこで、上記反応条件により部分的にリンカーを切断した、VB22B sc(Fv)₂ bulk、peak1、peak2をTSK Super2000(TOSOH)を用いてゲルろ過クロマトグラフィー分析を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーは以下の条件で行った。

移動相：DPBS(-) pH7.4

流速：0.2ml/min

その結果、図5に示すように、peak2では低分子量のピークが全く確認されなかったのに対して、peak1は低分子量(約半分の分子量)のピークが確認された。peak1とpeak2の混合物であるVB22B sc(Fv)₂ bulkは、peak1の存在比に相当する量の低分子量のピークが確認された。よって、peak1はbivalent scFv型、peak2はsingle chain diabody型であると同定された。

[0151] 一連の手法により、VB22B sc(Fv)₂に含有する構造異性体を分離し、その構造を同定することが可能となった。公知文献では、構造異性体の構造はモデル予測にて推定していたが、本検討により分離された構造異性体の構造を同定する方法を見出した。またイオン交換クロマトグラフィーのピーク面積から、VB22B sc(Fv)₂に含有するbivalent scFv構造とsingle chain diabody構造の構造異性体の存在比を定量的に評価することが可能となった。

[0152] 1-4. VB22B sc(Fv)₂の構造異性体の生物活性評価

抗ヒトMpl抗体VB22B sc(Fv)₂は、文献(Blood 2005;105:562-566)においてTPO様アゴニスト活性を示すことが報告されている。そこで、TPO依存性増殖を示すBaF3-human MplまたはBaF3-monkey Mplを用いて分離した構造異性体のTPO様アゴニスト活性を評価した。

[0153] 各細胞を1% Fetal Bovine Serum(Invitrogen)を含むRPMI1640 (Invitrogen)で2回洗浄した後、 4×10^5 cells/mLとなるように10% Fetal Bovine Serumを含むRPMI1640に懸濁し、60 μ L/wellで96well plateに分注した。rhTPO (R&D)または構造異性体サンプルの濃度を振り、各wellに40 μ L加え、37°C、5%CO₂条件下で、24時間培養した。10 μ L/wellでWST-8試薬(Cell Count Reagent SF、ナカライテスク)を加え、直後にBenchm

ark Plusを用いて450nmの吸光度(対照655nm)を測定し、2時間培養後に、再度450 nmの吸光度(対照655nm)を測定した。WST-8試薬は生細胞数に応じて450nmの発色反応を呈することから、2時間の吸光度変化を指標にTPO様アゴニスト活性を評価した。

[0154] 精製したVB22B sc(Fv)2の構造異性体を用いて、BaF3-human Mpl、BaF3-monkey MplにおけるTPO様アゴニスト活性を評価した結果をそれぞれ図6に示す。peak1とpeak2の構造異性体のアゴニスト活性を比較すると、peak2の方が著しく高い活性を示すことが明らかになった。このことから、抗Mpl抗体sc(Fv)2がTPO様アゴニスト活性を発揮するためには、single chain diabodyの構造を取る必要があることが示唆された。

[0155] [実施例2] hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の構造異性体の分離、構造決定、および活性評価

2-1. ヒト化抗ヒトMpl抗体hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の作製

実施例1で作製したVB22B sc(Fv)2の可変領域のフレームワーク領域(以下、FR)に相補性抗原決定領域(以下、CDR)を移植したヒト化抗体を作製した。具体的には、リンカー配列(GlyGlyGlyGlySer)₃ (配列番号:1)をコードする塩基配列をコードする塩基配列を用いて、VH-リンカー配列-VL-リンカー配列-VH-リンカー配列-VLで構成される塩基配列(配列番号:4)を持つような遺伝子になるように、50base程度の合成オリゴDNAを約20base程度ハイブリダイズするように設計し、これらの合成オリゴDNAをPCR法によりアッセンブリさせて各可変領域をコードする遺伝子を作製した。得られた遺伝子を動物細胞で発現するように、実施例1-1の方法と同様に発現ベクター構築、定常発現CHO-DG44細胞株の作製を行い、培養上清を回収した。ヒト化抗体 hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2はFlagタグを付加していないことから、培養上清からの精製は、VB22B sc(Fv)2が認識するエピトープであるMG10(ヒトMplアミノ酸配列のGln213からAla231)とGST融合蛋白質を利用して行った。MG10とGST融合蛋白質の精製は、Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences社製)を用いて、メーカーのプロトコールに従って精製した。さらに、精製したMG10とGST融合蛋白質をメーカーのプロトコールに従って、HiTrap NHS-activated HP (Amersham Biosciences社製)に固定化し、アフィニティカラムを作製した。ヒト化抗体 hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2発現CHO細

胞の培養上清をMG10-GST融合蛋白質固定化カラムに流し、ヒト化抗体 hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2を吸着させ、100mM Glycine-HCl(pH3.5),0.01% Tween80で溶出させた。溶出画分は直ちに1M Tris-HCl(pH7.4)で中和を行い、HiLoad 16/60 Superdex200 pg(Amersham Biosciences社製)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーの緩衝液は、20mMクエン酸緩衝液(pH7.5), 300mM NaCl, 0.01% Tween 80を使用した。

[0156] 2-2. hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の構造異性体の分離、精製

hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2は VH_1 -linker- VL_2 -linker- VH_3 -linker- VL_4 の配列を有するsc(Fv)2であることから、VB22B sc(Fv)2と同様に構造はFv(VH , VL 間で非共有結合した分子)の組み合わせにより、 VH_1 と VL_2 、 VH_3 と VL_4 がそれぞれFvを形成するbivalent scFv型と、 VH_1 と VL_4 、 VH_2 と VL_3 がそれぞれFvを形成するsingle chain diabody型の2種類の構造異性体が存在すると考えられる(図1)。

[0157] hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の構造異性体の分離を検討した結果、陽イオン交換クロマトグラフィーBioAssist S(TOSOH)を用いて、下記の溶離条件によりhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の各種成分の分離できることが示唆された。

移動相A : 20mM sodium phosphate, pH7.5

移動相B : 20mM sodium phosphate, 500mM NaCl, pH7.5

流速 : 0.8ml/min

グラジエント : B0%→B35%(30min)

[0158] 上記条件により、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2は2つのピークに分離した。図7に示すようなクロマトグラムが得られ、保持時間の短いピークからそれぞれ、peak1、peak2と命名した。

[0159] peak1及びpeak2に関して、Q-TOF型質量分析計(Q ToF Ultima, Micro Mass)を用いて分子量の測定を行った。Q-TOFにinfusionにて試料溶液を導入し、得られた多価イオンスペクトル(+)を、付属ソフト(MassLynx)を用いたデコンボリューションを行った結果、peak1の分子量として53768Da、peak2の分子量とし53769Daを得た。このことから、peak1とpeak2は同一の分子量を有することが分かった。

[0160] peak1及びpeak2に関して、ペプチドマッピングを行った。還元変性、carboxymethyl

化後、トリプシンを用いてペプチド断片に分解し、逆相クロマトグラフィー (YMC-Pack-ODS) によりペプチドマップを得た。Peak1とpeak2のペプチドマップを比較したところ、図8に示すようにpeak1とpeak2のマッピングのパターンは同一であったことから、アミノ酸一次構造は同一であることが分かった。

[0161] hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2は糖鎖付加がなく、peak1とpeak2はTOF-MASS測定による分子量が同一であること、peak1とpeak2はマッピングのパターンが同一であることから、peak1とpeak2は互いに異なる立体構造を有する構造異性体(conformational isomer)であることが分かった。

[0162] hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2は VH_1 -linker- VL_2 -linker- VH_3 -linker- VL_4 の配列を有するsc(Fv)2であることから、図1に示すとおり、構造はFv(VH,VL間で非共有結合した分子)の組み合わせにより、 VH_1 と VL_2 、 VH_3 と VL_4 がそれぞれFvを形成するbivalent scFv型と、 VH_1 と VL_4 、 VH_2 と VL_3 がそれぞれFvを形成するsingle chain diabody型の2種類の構造異性体が存在し、peak1とpeak2はそれぞれbivalent scFv型とsingle chain diabody型のどちらかの構造であると考えられた。

[0163] 2種類の構造異性体を同定する分析法として、プロテアーゼ限定分解法を見出した。sc(Fv)2のリンカー部分は、比較的自由的な構造を取っているためプロテアーゼに対する耐性が低いと考えられ、プロテアーゼの一種であるsubtilisin Aを用いて、以下の条件でpeak1及びpeak2及びhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 (peak1 : peak2 ~ 1 : 4)と反応させた。

20mM sodium citrate, 150mM NaCl, pH7.5

hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak1 or peak2 : 0.15mg/mL

Subtilisin A : 10ug/mL

37°C, 30min

[0164] 反応後、Phastgel Homogeneous 12.5%を用いて、還元SDS-PAGEを行った。その結果、図9に示すとおり、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulk、peak1、peak2いずれも同様のバンドパターンを示した。hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の3箇所のリンカー部分の切断によると思われる各断片の特異的なバンドが得られたことから、上記反応条件を用いることで、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のリンカー部分を部分的且つ限定的に分解できること

が分かった。

- [0165] bivalent scFv型とsingle chain diabody型の構造において、3つのうちのリンカーの一箇所の切断が起こった場合、図4に示すように、未変性状態では、VHとVLの間の非共有的な結合によりsingle chain diabody型の構造においては、3つのうちのどのリンカーに切断が起こっても見かけの分子量には変化が見られないが、bivalent scFv型においては、中央のリンカーに切断が起こった場合、半分の分子量の分子種が生成する。そこで、上記反応条件により部分的にリンカーを切断した、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulk、peak1、peak2をTSK SuperSW2000(TOSOH)を用いてゲルろ過クロマトグラフィー分析を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーは以下の条件で行った。

移動相：DPBS(-) pH7.4

流速：0.2ml/min

その結果、図10に示すように、peak2においては低分子量のピークが全く確認されなかったのに対して、peak1においては低分子量(約半分の分子量)のピークが確認された。peak1とpeak2の混合物であるhVB22B sc(Fv)2 u2-wz4 bulkは、peak1の存在比に相当する量の低分子量のピークが確認された。よって、本結果より、peak1がbivalent scFv型であり、peak2がsingle chain diabody型であると同定された。

- [0166] 2-3. hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の構造異性体の結合活性評価

hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2より分離したpeak1、peak2及びhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の結合活性の評価を以下のとおり行った。Biacore 3000(Biacore社製)にSensor Chip CM5(Biacore社製)を装着し、アミンカップリング法にて2-1で示したMG10(ヒトMplのGln 213からAla231とGST融合蛋白質)を固定化した。測定のランニングバッファーはHBS-EP Buffer(Biacore社製)を使用し、流速は20 μ L/minとした。HBS-EP Bufferにより、およそ5 nMから150 nM程度の6点の濃度になるように、ヒト化VB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulk、peak1、peak2を調製し、前述のMG10固定化セルに、これらのサンプルをそれぞれ、2分間添加して結合領域を得た後に、解離領域を2分間測定した。MG10-GST融合蛋白質に結合したVB22B sc(Fv)2は、20mM HClを1分間添加して除去し、固定化セルを再生した。得られたセンサーグラムより、BIAevaluation ver.3.1ソフトウェア(Biacore社製)を用いて、Bivalent analyte modelを適用し、結合速度定数(k_a)・解離速度

定数(kd)を算出した。その結果、表1に示すとおり、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulk, peak1, peak2の解離定数(KD)は、それぞれ 1.02×10^{-8} M, 1.24×10^{-8} M, 9.92×10^{-9} Mであり、ほぼ2つの構造異性体はほぼ同等の結合活性を持つことが分かった。

[0167] [表1]

	$k_a(1/Ms) [\times 10^5]$	$k_d(1/s) [\times 10^3]$	KD (nM)	
VB22B peak1	5.86 ± 0.06	7.27 ± 0.25	12.4 ± 0.05	n=3
VB22B peak2	5.71 ± 0.17	5.66 ± 0.24	9.92 ± 0.53	n=3
VB22B bulk	6.08 ± 0.30	6.17 ± 0.23	10.2 ± 0.8	n=3

[0168] 2-4. hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の構造異性体のアゴニスト活性評価

peak1及びpeak2及びhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のアゴニスト活性の評価を行った。図11に示すように、アゴニスト活性は構造異性体間で大きく異なり、single chain diabody構造のpeak2が非常に高いアゴニスト活性を示したのに対して、bivalent scFv構造のpeak1の活性は極めて小さかった。2つの構造異性体は、結合活性はほぼ同程度であったのに対して、アゴニスト活性は著しく異なった。公知文献においては構造異性体の分離・同定が行われていなかったため、本検討で初めて2種類の構造異性体の間で生物学的な活性が異なることが見出された。

[0169] 本実施例において、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2に含有する構造異性体を分離し、その構造を同定することが可能となった。またクロマトグラフィーのピーク面積により、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2に含有するbivalent scFv構造とsingle chain diabody構造の構造異性体の存在比を定量的に分析することが可能となった。hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2においてはbivalent scFv構造とsingle chain diabody構造ではアゴニスト活性に著しい違いがあることが分かり、これらの活性の著しく異なる構造異性体を含むhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2を医薬品として開発するためには、2種類の構造異性体の性質を決定し、各構造異性体の含有比率を定量的に分析する規格試験は必要不可欠である。

[0170] [実施例3] VB22B sc(Fv)2リンカー改変体の構造異性体存在比の分析および構造異性体比の制御

VB22B sc(Fv)2は VH_1 -linker- VL_2 -linker- VH_3 -linker- VL_4 の配列を有するsc(Fv)2であることから、構造はFv(VH,VL間で非共有結合した分子)の組み合わせにより、V

H_1 と VL_2 、 VH_3 と VL_4 がそれぞれFvを形成するbivalent scFv型と、 VH_1 と VL_4 、 VH_2 と VL_3 がそれぞれFvを形成するsingle chain diabody型の2種類の構造異性体が存在すると考えられる。

- [0171] 中央のリンカーをmiddle linkerとし、両端のリンカーをedge linkerとし、図12に示すようなmiddle linkerあるいはedge linkerの長さの異なる各種VB22B sc(Fv)₂を作製し、それらの構造異性体存在比の定量的な分析を以下の条件で行った。

カラム : MONO Q (Amershambioscience)

移動相A : 20mM Tris-HCl, pH8.0

移動相B : 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH8.0

流速 : 1.0ml/min

グラジエント : B0%→B35%(30min)

- [0172] その結果、図13に示すように、任意の長さのリンカーにおいて実施例2に示した分析法により2つの構造異性体を分離することができ、構造異性体存在含有比率を測定することが出来た。リンカーの長さによって、bivalent scFv型とsingle chain diabody型の比を制御することが可能であることが分かり、本分析法を用いることにより目的の構造異性体比を得ることが出来る適切なリンカー長を設計することが可能となった。

- [0173] 公知文献では、2つの構造異性体の構造同定法、及び、定量的な分析法が見出されていなかったため、このようなリンカーの長さで構造異性体の存在比を定量的に評価することは出来なかった。Protein Engineering, 1993, 6(8), 989-995やProtein Engineering, 1994, 7(8), 1027-1033等においてリンカーの長さが12以下の場合、近接するVHとVL同士はFvを形成しにくいことが一般的に報告されていたが、本検討により、G5やG10においては、近接するVHとVL同士がFvを形成したsingle chain diabody型の構造が少量ながら存在することが分かった。すなわち、いかなるリンカーにおいても2つの構造(すなわち構造異性体)が存在する可能性が考えられた。そのため医薬品としてsc(Fv)₂型の分子を開発するためには、いかなるリンカーにおいても構造異性体の存在比率を定量的に分析する必要があると考えられ、このことから構造異性体の存在比率を定量的に分析可能且つ分離生成可能な本分離分析法は、sc(Fv)₂型の医薬品分子を開発するにあたって極めて有用である。

[0174] 【実施例4】陽イオン交換クロマトグラフィー (SOURCE 15S) による構造異性体の大量精製

実施例2-1で使用したhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2発現CHO細胞の培養上清から精製を行った。培養上清は、精製水で3倍に希釈した後、1 M酢酸でpHを6.0に調整した。この後、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0で平衡化したSP Sepharose Fast Flow column(Amersham Biosciences社製)にかけ、同緩衝液でカラムを洗浄後、同緩衝液中0 Mから0.5 MまでのNaClの直線濃度勾配で、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した(第一工程)。得られた画分をTrisGlycine SDS gel 12%を用いた還元SDS-PAGEで分析し、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2を含む画分を集めた。

[0175] 第一工程のhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2画分は、10 mMリン酸緩衝液、pH 6.8で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム、タイプI, 20 μ m (BIO-RAD社製)に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、pH 6.8のリン酸緩衝液濃度を160 mMまで直線的に上げ、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した(図14)。メインピークの後に、小さなピークが溶出したが、SDS-PAGE分析の結果、これらはいずれもhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2であることが確認された。図14右に示したように、Superdex 200 PC 3.2/30 column(Amersham Biosciences社製)を使用した分析ゲルろ過により、メインピークはほとんどがhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のモノマーであり、後ろのピークはhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のダイマー以上のアグリゲート画分であることがわかった。以上より、この工程でhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のモノマー画分を分離できることがわかった。

[0176] 第二工程で得られたhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のモノマー画分は、精製水で5倍に希釈した後、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0で平衡化したSOURCE 15S column (Amersham Biosciences社製)にかけ、同緩衝液でカラムを洗浄後、同緩衝液中0 mMから36 mMまでのNaClの直線濃度勾配をかけたのち、2つのピークを最大限に分離して溶出させるため、一旦36 mM でNaClの濃度を固定した。図15に示すように、2つのhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のピークが溶出されたのち、再びNaClの濃度を上げて、さらに強くカラムに吸着したポリペプチドを溶出しカラムを洗浄した。これら2つのピークは、2-2で示したBioAssist Sカラムによる分析で、先に溶出するメインピークがpeak2で、後から溶出するのがpeak1であることが判明した(図16)。

[0177] 精製したhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のpeak1とpeak2は、前述のSDS gelを用いて還元と非還元両条件でSDS-PAGE分析をおこなったところ、いずれも分子量約55 kDaの位置にシングルバンドとして観察された(図17)。さらにhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のpeak1とpeak2は、1-3で示したTSK Super2000カラムによるゲルろ過クロマトグラフィー分析で、いずれもシングルピークで見かけ上の分子量約50 kDaを示した(図18)。

[0178] 以上より、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の目的とする構造異性体のモノマーのみを、大量精製に不向きなゲルろ過クロマトグラフィーを使用せずに精製する方法の開発に成功した。

[0179] [実施例5] VH/VL界面改変型sc(Fv)2の作製、構造異性体分析および同定

5-1. VH/VL界面改変型sc(Fv)2の作製

実施例2で作製したhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2(以下、u2-wz4)のVH/VL界面を形成するアミノ酸であるVHの39番目(WO2005/56604の配列番号:289に記載のアミノ酸配列における39位)のGlnとVLの38番目(WO2005/56604の配列番号:291に記載のアミノ酸配列における43位)のGlnを以下のようにして改変した。u2-wz4は[VH1]リンカー[VL2]リンカー[VH3]リンカー[VL4]の順にアミノ酸リンカー配列(GlyGlyGlyGlySer)x3(配列番号:1)で連結されており、配列番号4に記載した塩基配列で転写、翻訳される。はじめに、VH1の39番目のGln(遺伝子コドンCAG)をGlu(遺伝子コドンGAG)に、VL2の38番目のGln(遺伝子コドンCAG)をGlu(遺伝子コドンGAG)に、VH3の39番目のGln(遺伝子コドンCAG)をLys(遺伝子コドンAAG)に、VL4の38番目のGln(遺伝子コドンCAG)をLys(遺伝子コドンAAG)に改変した遺伝子hVB22B u2-wz4(v1) sc(Fv)2(以下v1、塩基配列を配列番号:5に、アミノ酸配列を配列番号:6に示す)を作製した。さらに、VH1の39番目のGln(遺伝子コドンCAG)をGlu(遺伝子コドンGAG)に、VL2の38番目のGln(遺伝子コドンCAG)をLys(遺伝子コドンAAG)に、VH3の39番目のGln(遺伝子コドンCAG)をLys(遺伝子コドンAAG)に、VL4の38番目のGln(遺伝子コドンCAG)をGlu(遺伝子コドンGAG)に改変した遺伝子hVB22B u2-wz4(v3) sc(Fv)2(以下v3、塩基配列を配列番号:7に、アミノ酸配列を配列番号:8に示す)を作製した。遺伝子の改変はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE社製)を用いてメーカーのプロトコールに従い、点突然変異を導入した。各遺伝子の

塩基配列を確認した後、DNA断片を発現ベクターpCXND3にクローニングして発現ベクターを構築し、CHO-DG44細胞に遺伝子導入することで、安定発現細胞株を作製した。具体的には、発現ベクター(20 μ g)とPBSに懸濁したCHO-DG44細胞(1×10^7 細胞/mL)の0.75mLを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後Gene Pulser Xcell(BioRad)を用いて1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、500 μ g/mL Geneticin(Invitrogen)を含むCHO-S-SFMII培地(Invitrogen)に加えて選抜し、v1産生CHO細胞株およびv3産生CHO細胞株を樹立した。

- [0180] VH/VL界面改変型sc(Fv)2はFlagタグを付加していないことから、培養上清からの精製は、VB22B sc(Fv)2が認識するエピトープであるMG10(ヒトMplアミノ酸配列のGln 213からAla231)とGST融合蛋白質を利用して行った。MG10とGST融合蛋白質の精製は、Glutathione Sepharose 4B(Amersham Biosciences社製)を用いて、メーカーのプロトコールに従って精製した。さらに、精製したMG10とGST融合蛋白質をメーカーのプロトコールに従って、HiTrap NHS-activated HP(Amersham Biosciences社製)に固定化し、アフィニティカラムを作製した。v1発現CHO細胞株またはv3発現CHO細胞株の培養上清をMG10-GST融合蛋白質固定化カラムに流し、v1またはv3を吸着させ、100mM Glycine-HCl(pH3.5), 0.01% Tween80で溶出させた。溶出画分は直ちに1M Tris-HCl(pH7.4)で中和を行い、HiLoad 16/60 Superdex200pg(Amersham Biosciences社製)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、モノマー分子を精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーの緩衝液は、20mMクエン酸緩衝液(pH7.5), 300mM NaCl, 0.01% Tween 80を使用した。図19に示したゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、改変体v1, v3は培養上清中でダイマー以上の凝集体が低下し、モノマー比率は改変前のu2-wz4の59%と比較して、v1が89%、v3が77%と上昇していることが明らかになった。改変体v1, v3はVH/VL界面のアミノ酸を改変することにより、電荷的な反発により好ましくない会合を阻害し、好ましい会合を促進したことが推測される。以上のことからこの会合制御により、効率的なモノマー分子の発現に成功した。

- [0181] 5-2.VH/VL界面改変型sc(Fv)2の構造異性体分析および同定

得られたVH/VL界面改変体であるv1, v3および未改変体であるu2-wz4の構造異

性体存在比を陽イオン交換クロマトグラフィーおよび等電点電気泳動により分析した。また、プロテアーゼ限定分解法による構造同定を実施した。

陽イオン交換クロマトグラフィーは以下のとおり実施した。

カラム: TSK-gel Bioassist S, 4.6 mm ϕ \times 50 mm (TOSOH社製)

流速: 0.8 mL/min

検出波長: 220 nm

溶出条件:

Eluent A: 20 mmol/L Phosphate buffer (pH 7.0)

Eluent B: 20 mmol/L Phosphate buffer / 500 mmol/L NaCl (pH 7.0)

グラジエント:

Time(min)	B%
0	0
5	0
25	30
25.1	100
35	100
35.1	0

[0182] 等電点電気泳動は以下のとおり実施した。PhastGel Dry IEFゲル(Amersham Biosciences社製)を以下のゲル膨潤液にて30分以上膨潤した。試料を先に膨潤させたゲルに添加し、PhastSystemにより以下の泳動条件で電気泳動した。泳動後、20% TCA溶液に30分間浸した後、ミリQ水で5分間 \times 3回以上洗浄し、試料のタンパク質濃度に応じてクマシー染色、または銀染色した。クマシー染色では、染色液として0.1% CuSO₄ (w/v)を含む0.02% CBBを用い、染色を行い、10%酢酸を含む30%メタノールで脱色した。銀染色では、Silver stain kit, Protein (Amersham Biosciences社製)を用い、キットに添付された標準プロトコールにより染色を行った。

<ゲル膨潤液>

Pharmalyte 8.5-10	80 μ L
Biolyte 7-9	10 μ L

Biolyte 3-9 10 μ L

20% Glycerol 2.0mL

<電気泳動プログラム>

SAMPLE APPLICATION DOWN AT step2 0Vh

SAMPLE APPLICATION UP AT step3 0Vh

Step 1 2000V 2.5mA 3.5W 15°C 75Vh

Step 2 200V 2.5mA 3.5W 15°C 15Vh

Step 3 2000V 2.5mA 3.5W 15°C 410Vh

- [0183] プロテアーゼ限定分解法による構造同定は以下の条件で実施した。subtilisin Aを用いて、以下の条件でu2-wz4精製peak1とu2-wz4精製peak2、及び、改変体v1と改変体v3を反応させた。

20mM sodium citrate, 150mM NaCl, pH7.5

hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak1 or peak2 : 0.15mg/mL

Subtilisin A : 10ug/mL

37°C, 30min

- [0184] 得られた反応液をゲルろ過クロマトグラフィーにより以下の条件で分析した。

Column : TSKgel Super2000sw (TOSOH)

Eluent : 50mM sodium phosphate, 300mM KCl, pH7.0

Flow rate : 0.2ml/min

Detection : 220nm

- [0185] 図20および図21に示した陽イオン交換クロマトグラフィーと等電点電気泳動による構造異性体の分析結果から、u2-wz4は24%がbivalent scFv型、76%がsingle chain diabody型として両構造異性体の混合物として発現しているのに対して、改変体v1は100%がsingle chain diabody型の構造異性体として発現しており、改変体v3は100%がbivalent scFv型の構造異性体として発現していることが分かった。また図22に示すとおり、プロテアーゼ限定分解の結果からも、改変体v3はu2-wz4精製peak1と同様に低分子のピークが見られ、改変体v1はu2-wz4精製peak2と同様に低分子のピークが見られなかったことから、改変体v1はsingle chain diabody型の構造異性体として発現して

おり、改変体v3はbivalent scFv型の構造異性体として発現していることが示された。

[0186] [実施例6] VH/VL界面改変型sc(Fv)2の活性評価および安定性評価

6-1. VH/VL界面改変型sc(Fv)2の生物活性評価

実施例1に示す方法に従って、VH/VL界面改変体v1およびv3のアゴニスト活性の評価を行った。アゴニスト活性は構造異性体間で大きく異なり図11に示すように、single chain diabody構造のpeak2が非常に高いアゴニスト活性を示すのに対して、bivalent scFv構造のpeak1の活性は極めて低下する。図23に示すとおり、改変体v1はpeak2と同等の活性を示し、改変体v3はpeak1とほぼ同等の活性を示した。以上のことから生物活性においても、改変体v1がsingle chain diabody構造を、改変体v3がbivalent scFv構造を形成していることが確認された。

[0187] 6-2. VH/VL界面改変型sc(Fv)2の安定性評価

u2-wz4精製peak1とu2-wz4精製peak2、および、改変体v1と改変体v3の安定性評価として、示差走査型熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry) を用いて変性中間温度 (T_m値) の測定を以下の条件下で行った。

DSC : N-DSCII (Applied Thermodynamics社製)

溶液条件: 20mM sodium citrate, 300mM NaCl, pH7.0

タンパク質濃度: 0.1mg/mL

スキャン速度: 1℃/分

[0188] 各DSC測定の結果を図24に示した。u2-wz4精製peak2と改変体v1のT_m値は未改変体とほぼ同等であり、安定性は同等であることが分かった。u2-wz4精製peak1と改変体v3とでは、若干改変体v3のほうが低い安定性を示した。knobs-into-hole 技術を用いた方法による界面制御においては、例えばIgGのCH3ドメインのヘテロ会合において、未改変CH3ドメインのT_m値が80.4℃であったのに対して、改変CH3ドメインのT_m値は69.4℃であり、大幅にT_m値が低下し安定性が低下してしまうことが報告されている (Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26, 649-658)。それに対して、本発明においては安定性を低下させることなく会合を制御できることが確認された。

[0189] 続いて、u2-wz4精製peak1とu2-wz4精製peak2およびVH/VL界面改変体である改変体v1と改変体v3の安定性評価として、以下の条件における熱加速試験による安定

性評価を実施した。

〈熱加速条件〉

溶液条件: 20mM sodium citrate, pH6.0

タンパク質濃度: 0.25mg/mL

加速条件: 40°C-6day, 12day

熱加速サンプルは、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーにより以下の条件で分析した。

- [0190] 図25に示すとおり、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析の結果、u2-wz4精製peak2と改変体v1のモノマー残存率はほぼ同等であり、会合化に対する安定性はほぼ同等であることが確認された。また、u2-wz4精製peak1と改変体v3のモノマー残存率もモノマー残存率はほぼ同等であり、両構造異性体において会合化に対する安定性はほぼ同等であることが分かった。
- [0191] 図26に示すとおり、陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析の結果、未改変体の精製peak1は異性化反応によりpeak2に異性化し、未改変体精製peak2は異性化反応によりpeak1に異性化したのに対して、VH/VL界面改変体v1とv3は熱加速後も異性化反応は起こさなかった。VH/VL界面の改変を適用することによって、2種類の構造異性体のうち一方のみの構造異性体が100%の状態が発現できることに加えて、得られた各構造異性体は異性化反応を起こさず安定に保存可能であることが分かった。
- [0192] 本実施例において、v1およびv3に適用したVH/VL界面改変を用いることによって、2種類の構造異性体のうち一方のみの構造異性体が100%存在する状態で発現できることを見出した。目的の構造の一本鎖抗体を得るためのVH/VL界面制御としては、knobs-into-hole 技術を用いてBispecific diabodyの構造を制御する方法 (Protein Sci . 1997 Apr;6(4):781-8, Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation., Zhu Z, Presta LG, Zapata G, Carter P.) が知られている。この方法では、VH/VL界面あたり合計4箇所のアミノ酸を改変することにより目的のヘテロダイマー構造の形成率が72%から92%まで上昇したことを報告している。それに対して、本発明は4箇所のアミノ酸 (VH/VL界面あたりでは2箇所のアミノ酸) を改変することにより、熱安定性および構造異性体の安定性を低下させることなく、目的の構造を100%の比率で

取得することに成功した。

[0193] [実施例6] ヒト化抗ヒトIL-6受容体抗体 sc(Fv)2の構造異性体の分離、構造決定

6-1. ヒト化抗ヒトIL-6受容体抗体sc(Fv)2の作製

Sato K.ら(Cancer Research 1993;53:851-856)により報告されているヒト化抗ヒトIL-6受容体抗体のVHとVLを用いて、リンカー配列(GlyGlyGlyGlySer)_{x3}(配列番号:1)をコードする遺伝子を用いて、VH-リンカー配列-VL-リンカー配列-VH-リンカー配列-VLで構成されるように連結したsc(Fv)2遺伝子(アミノ酸配列;配列番号:18、塩基配列;配列番号:19)を作製した。得られた遺伝子を動物細胞で発現するように、発現ベクターpMCDNに挿入した。本ベクターpMCDNの構築の流れについて、以下に述べる。pUC19ベクターにマウスサイトメガロウイルス(mCMV)エンハンサーおよびプロモーター、シミアンウイルス-40(SV40)の後期ポリアデニル部位を挿入したベクターをpMCと命名した。次に、DHFR-ΔE-rVH-PM1-f(WO92/19759参照)の抗体H鎖遺伝子とベクターを分割するために、制限酵素EcoRI, SmaI部位で消化し、ベクター側のみ回収した後に、EcoRI-NotI-BamHI adaptor(宝酒造)をクローニングした。このベクターをpCHOIと命名した。pCHOIのDHFR遺伝子発現部位とpCXN(Niwaら、Gene 1991;108:193-200)の制限酵素のNeomycin耐性遺伝子発現部位をpMCベクターに挿入した発現ベクターをpMCDNと命名した。構築したヒト化抗ヒトIL-6受容体抗体 sc(Fv)2発現ベクターを制限酵素で直鎖上にしたのちに、CHO-DG44細胞に遺伝子導入して抗体発現細胞株を樹立した。

[0194] 安定発現細胞株の作製は次に示すようにして行った。細胞への遺伝子導入は、GenePulserXcell(Bio-Rad)を用いたエレクトロポレーション法により行った。各抗体発現ベクターとPBSに懸濁したCHO細胞(1×10^7 細胞/mL)の0.75mLを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、HT supplement(Invitrogen)を1倍濃度で含むCHO-S-SFMII培地(Invitrogen)40mLに懸濁した。同様の培地で10-50倍希釈液を作製し、96ウェル培養用プレートに100 μ L/wellで分注した。CO₂インキュベーター(5% CO₂)で24時間培養後、Geneticin(Invitrogen)を0.5mg/mLになるように添加して、2週間培養した。薬剤耐性を示す形質転換

細胞のコロニーを順次拡大培養し、樹立した高産生細胞株を用いて大量培養を行い、培養上清を得た。

[0195] ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 のL鎖がProtein Lに結合することを利用して、ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2発現CHO細胞の培養上清をProtein L (Actigen社製)を充填したカラムに流し、ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2を吸着させ、100mM Glycine-HCl(pH2.7)で溶出させた。溶出面分は直ちに1M Tris-HCl(pH8.5)で中和を行い、HiLoad 26/60 Superdex200pg (Amersham Biosciences社製)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーの緩衝液は、ダルベッコPBSを使用した。

[0196] 6-2. ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2の構造異性体の分離、精製

ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2は VH_1 -linker- VL_2 -linker- VH_3 -linker- VL_4 の配列を有するsc(Fv)2であることから、実施例1のVB22B、実施例2のhVB22Bと同様にFv(VH , VL 間で非共有結合した分子)の組み合わせにより、構造は VH_1 と VL_2 、 VH_3 と VL_4 がそれぞれFvを形成するbivalent scFv型と、 VH_1 と VL_4 、 VH_2 と VL_3 がそれぞれFvを形成するsingle chain diabody型の2種類の構造異性体が存在すると考えられる(図1)。ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2の構造異性体の分離を検討した結果、下記の溶離条件下で陽イオン交換クロマトグラフィーBioAssist S (TOSOH)を用いることによりヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2の構造異性体の分離に成功した。

<溶離条件>

移動相：20mM Tris-HCl pH8.5, 75 mM NaCl

流速：0.8ml/min

グラジエント：イソクラティック(グラジエント無し)

上記条件により、ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2は2つのピークに分離した。図27に示すようなクロマトグラムが得られ、保持時間の短いピークをpeak1、長いピークをpeak2と命名した。同方法によりPeak1とpeak2を精製することができた。精製後のpeak1とpeak2の陽イオン交換クロマトグラフィー分析の結果を図28に示した。

[0197] 6-3. ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2の構造異性体の同定

分取したヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2のpeak1とpeak2は構造異性体と考え

られたため、2種類の構造異性体を同定する分析法として、実施例1、2、3で実施したプロテアーゼ限定分解法を用いた。以下の条件でヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2のpeak1およびpeak2と反応させた。

PBS (pH7.4)

ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2 peak1 or peak2 : 0.05mg/mL

Subtilisin A : 0.5ug/mL

37°C, 60min

上記反応後、Phastgel Homogeneous 12.5%を用いて、還元SDS-PAGEを行った。その結果、図29に示すとおり、peak1、peak2いずれも同様のバンドパターンを示した。

上記反応条件により部分的にリンカーを切断した、peak1、peak2を以下の条件でTSK SuperSW2000(TOSO)を用いてゲルろ過クロマトグラフィー分析を行った。

移動相 : 50mM sodium phosphate, 300mM KCl, pH7.0

流速 : 0.2ml/min

[0198] その結果、図30に示すように、peak1においては低分子量のピークがほとんど確認されなかったのに対して、peak2においては低分子量(約半分の分子量)のピークが確認された。よって、本結果より、peak1がsingle chain diabody型であり、peak2がbivalent scFv型であると同定された。図27よりヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2においてはpeak1よりもpeak2の含量が多いことから、ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2においてはbivalent scFv型が主成分であり、single chain diabody型はマイナー成分であることが分かった。実施例1におけるVB22B sc(Fv)2、および実施例2におけるhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2においては、single chain diabody型が主成分であったことから、sc(Fv)2の変換領域配列の違いにより、構造異性体の含有率が大きく変化することが分かった。構造異性体含有率がsc(Fv)2の変換領域配列により大きく変化することから、sc(Fv)2を医薬品として開発するにあたっては、構造異性体の分離と構造同定は重要であると考えられる。

[0199] [実施例7] ヒト化抗ヒトIL-6受容体抗体 sc(Fv)2の構造異性体の活性評価

7-1. ヒトgp130発現BaF3細胞株、ヒトgp130/ヒトIL-6受容体共発現BaF3細胞株の樹立

IL-6依存増殖性を示す細胞株を得るために、以下に示すとおり、ヒトgp130を発現したBaF3細胞株の樹立を行った。

全長ヒトgp130 cDNA (Hibiら、Cell 1990;63:1149-1157 (GenBank # NM_002184)) をPCRにより増幅し、pCHOI (Hirataら、FEBS Letter 1994;356:244-248)のDHFR遺伝子発現部位を除去し、Zeocin耐性遺伝子発現部位を挿入した発現ベクターpCOS2Zeoにクローニングし、pCOS2Zeo/gp130を構築した。

10 μ gのpCOS2Zeo/gp130をPBSに懸濁したBaF3細胞(0.8×10^7 cells)に混合し、Gene Pulser (Bio-Rad)を用いて0.33kV、950 μ FDの容量でパルスを加えた。エレクトロポレーション処理により遺伝子導入したBaF3細胞を0.2ng/mLのmouse interleukin-3 (Peprotech)、10% Fetal Bovine Serum (以下FBS、HyClone)を含むRPMI1640培地 (Invitrogen)で一昼夜培養し、100ng/mLのhuman interleukin-6(R&D)、100ng/mLのhuman interleukin-6 soluble receptor (R&D systems)および10%FBSを含むRPMI1640培地を加えて選抜し、ヒトgp130発現BaF3細胞株 (以下、BaF3/gp130)を樹立した。

[0200] 7-2. ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2の構造異性体のヒトIL-6中和活性評価

IL-6依存性増殖を示すBaF3/gp130を用いて、以下に示すとおり、IL-6中和活性を評価した。精製したヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2の構造異性体を10 μ g/mLになるように10% FBSを含むRPMI1640に希釈した。この溶液を用いて希釈公比3、合計6系列の希釈液を調製し、96well-plate(FALCON)の各wellに50 μ Lずつ分注した。次に、BaF3/gp130を10% FBS (HyClone)を含むRPMI1640培地で3回洗浄した後に、 5×10^4 cells/mLとなるように60ng/mLのhuman interleukin-6 (R&D systems)、60ng/mLの可溶性ヒトIL-6受容体 (自社調製品) および10% FBSを含むRPMI1640培地に懸濁し、抗体サンプルを分注したwellに50 μ Lずつ混合した。ヒト可溶性IL-6受容体は以下に示す方法で調製した。ヒト可溶性IL-6受容体(Yamasakiら、Science 1988;241:825-828 (GenBank # X12830))の1番目から344番目のアミノ酸をコードする遺伝子をCHO細胞に導入後に培養上清から精製して調製した。

37°C、5%CO₂条件下で、72時間培養し、PBSで2倍に希釈したWST-8試薬 (Cell Counting Kit-8、株式会社同仁化学研究所)を20 μ L/wellで加え、直後にSUNRISE CLASSIC(TECAN)を用いて450nmの吸光度(参照波長620nm)を測定した。2時間培養し

た後に、再度450 nmの吸光度(参照波長620nm)を測定し、2時間の吸光度変化を指標にIL-6中和活性を評価した。

[0201] その結果、図31に示すとおり、ヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2の構造異性体 (peak1, peak2)は、分画前の精製品(bulk)と中和活性が同等であった。実施例1のVB 22B sc(Fv)2および実施例2のhVB22B sc(Fv)2においては、2つの構造異性体の間で活性に大きな違いが見られたが、本実施例のヒト化抗ヒト IL-6受容体抗体 sc(Fv)2においては中和活性に違いが見られなかった。このようにsc(Fv)2の2つの構造異性体の活性の差は、ターゲットとなる抗原の種類やsc(Fv)2分子のアミノ酸配列によって異なることが考えられ、sc(Fv)2分子を医薬品として開発するにあたっては、構造異性体の分離と構造同定および構造異性体の制御は重要であると考えられる。また実施例6で示されるように各構造異性体は保存中に異性化反応が起きる可能性があり、sc(Fv)2製剤の品質規格の点からも構造異性体の分離と構造同定および構造異性体の制御は重要であると考えられる。

[0202] [実施例8] VB22B sc(Fv)2のsingle chain diabodyを高収率で得る方法

VB22B sc(Fv)2より精製したsingle chain diabody (peak2)とbivalent scFv (peak1)をそれぞれ、20mM sodium acetate, 150mM NaCl, pH6.0の条件下、40℃においてインキュベートした。実施例1に示した陰イオン交換クロマトグラフィーの方法でpeak1とpeak2比を測定した結果、図32に示したように、peak1のピークエリアが減少し、それに代わって、peak2のピークエリアが増大した。そこで、peak1を同条件下で6日間インキュベートしたサンプルを実施例1に示した方法でアゴニスト活性を評価したところ、図33に示したようにincubateする前のサンプルに比べて大幅にアゴニスト活性が増大した。実施例1に示したとおりpeak1はsingle chain diabodyであるpeak2に比べて著しく活性が低いことから、bivalent scFvであるpeak1は、20mM sodium acetate, 150mM NaCl, pH6.0, 40℃でインキュベートすることによって、高活性のsingle chain diabodyであるpeak2に構造変換する(構造異性体が異性化する)ことが分かった。すなわち、これによりbivalent scFvとsingle chain diabodyの混合物を適当な条件下に暴露することによって、bivalent scFvであるpeak1をsingle chain diabodyであるpeak2に変換することが可能であり、peak2の含有率を増加させることが可能であることが示された。peak1から

peak2に異性化させる本方法を用いることで、細胞より産生されたpeak1とpeak2の混合物からpeak1をpeak2に異性化させることによって、高収率でsingle chain diabodyであるpeak2を得ることが可能である。

[0203] [実施例9] hVB22B sc(Fv)2のsingle chain diabody型を高収率で得る方法

実施例4においてhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2より精製したbivalent scFv (peak1)を20mM sodium citrate, 0mM/150mM/300mM NaCl, pH3.0/3.5/4.0/4.5/5.0/5.5/6.0/6.5/7.0/7.5の計30条件下、25℃において10日間インキュベートした。実施例1に示した陽イオン交換クロマトグラフィーの方法でpeak1とpeak2比を測定した結果、図34に示したように、インキュベート前に比べてpeak2存在比が増大した。これよりhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2においても、bivalent scFvであるpeak1は、single chain diabodyであるpeak2に構造変換することを見出した。その異性化速度は、低pH及び低塩濃度ほど早いことを見出した。Peak1からpeak2に異性化させる本方法を用いることで、細胞より産生されたpeak1とpeak2の混合物からpeak1をpeak2に異性化させることによって、高収率でsingle chain diabodyであるpeak2を得ることが可能である。

産業上の利用可能性

[0204] 本発明により、sc(Fv)2組成物中の2種の構造異性体を分離取得する方法、分離された2種の構造異性体の構造を同定する方法、及び、2種の構造異性体を定量的に分析する方法が提供された。またリンカー長を調節することによりsc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の割合を増加させる方法が提供された。さらに可変領域内のアミノ酸を改変することにより構造異性体の生成を制御する方法が提供された。これらの方法を利用することにより、sc(Fv)2の特定の構造異性体を有効成分として含有する医薬組成物を製造することができ、従来と比較して高活性の医薬組成物を提供することが可能となった。また、医薬品としての開発に必要な規格試験により、構造が同定された構造異性体の含有比率を規定したsc(Fv)2を医薬品組成物として提供することが可能となった。

請求の範囲

- [1] 以下の工程を含むsc(Fv)₂医薬組成物の製造方法。
- (a) sc(Fv)₂組成物中の構造異性体を分離する工程
 - (b) 分離された構造異性体のうち、特定の構造異性体を取得する工程
- [2] 以下の工程を含むsc(Fv)₂医薬組成物の製造方法。
- (a) sc(Fv)₂の構造異性体の活性を比較して高活性の構造異性体をあらかじめ決定する工程
 - (b) sc(Fv)₂組成物中の構造異性体を分離する工程
 - (c) 工程(a)により決定された高活性の構造異性体を取得する工程
- [3] 以下の工程を含むsc(Fv)₂医薬組成物の製造方法。
- (a) sc(Fv)₂組成物中の構造異性体の比率が好ましい値になるようにリンカーの長さを決定する工程
 - (b) 工程(a)で決定されたリンカーの長さを有するsc(Fv)₂組成物を作製する工程
 - (c) 作製されたsc(Fv)₂組成物中の構造異性体を分離する工程
 - (d) 分離された構造異性体のうち、特定の構造異性体を取得する工程
- [4] 以下の工程を含むsc(Fv)₂医薬組成物の製造方法。
- (a) リンカーの長さが異なる複数のsc(Fv)₂組成物を作製する工程
 - (b) sc(Fv)₂組成物中の構造異性体の比率が好ましい値となるリンカーを有するsc(Fv)₂を選択する工程
 - (c) 工程(b)で選択されたsc(Fv)₂のリンカーと同じ長さのリンカーを有するsc(Fv)₂組成物を作製する工程
 - (d) 作製されたsc(Fv)₂組成物中の構造異性体を分離する工程
 - (e) 分離された構造異性体のうち、特定の構造異性体を取得する工程
- [5] 構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [6] 構造異性体がアゴニスト活性を有することを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の製造方法。
- [7] sc(Fv)₂のリンカーが15アミノ酸であることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載

の製造方法。

- [8] 請求項1～7のいずれかに記載の製造方法により作製された医薬組成物。
- [9] sc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の割合が80%以上であることを特徴とする医薬組成物。
- [10] 構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である請求項9に記載の医薬組成物。
- [11] 構造異性体が受容体に結合することを特徴とする請求項9または10に記載の医薬組成物。
- [12] 構造異性体がアゴニスト活性を有することを特徴とする請求項9～11のいずれかに記載の医薬組成物。
- [13] sc(Fv)2のリンカーが15アミノ酸である請求項9～12のいずれかに記載の医薬組成物。
- [14] sc(Fv)2組成物中の構造異性体の割合を変化させる工程を含む、sc(Fv)2組成物の活性を調節する方法。
- [15] sc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の割合を増加させる工程を含む、sc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法。
- [16] 以下の工程を含むsc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法。
 - (a) sc(Fv)2組成物中の構造異性体を分離する工程
 - (b) 分離された構造異性体のうち、特定の構造異性体を取得する工程
- [17] 以下の工程を含むsc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法。
 - (a) sc(Fv)2の構造異性体の活性を比較して高活性の構造異性体をあらかじめ決定する工程
 - (b) sc(Fv)2組成物中の構造異性体を分離する工程
 - (c) 工程(a)により決定された高活性の構造異性体を取得する工程
- [18] 以下の工程を含むsc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法。
 - (a) sc(Fv)2組成物をイオン交換カラムにかける工程
 - (b) 特定の構造異性体を除去する工程
- [19] 構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である請求項14～18のい

ずれかに記載の方法。

- [20] sc(Fv)2組成物を加熱する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法。
- [21] 構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である請求項20に記載の方法。
- [22] sc(Fv)2組成物を15℃～50℃でインキュベートする工程を含む、sc(Fv)2組成物中のsingle chain diabody型の含有割合を増加させる方法。
- [23] sc(Fv)2の重鎖可変領域と軽鎖可変領域が界面を形成しているアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含むsc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法。
- [24] 以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法。
- (1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域の39位に相当するアミノ酸残基
- (2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における38位に相当するアミノ酸残基
- [25] 以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法。
- (1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基
- (2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基
- [26] 以下の(1)および(2)のいずれか一方のアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の特定の構造異性体の含有割合を増加させる方法。
- (1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ

酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

- [27] sc(Fv)2の重鎖可変領域と軽鎖可変領域が界面を形成しているアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含むsc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法。

- [28] 以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域の39位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における38位に相当するアミノ酸残基

- [29] 以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の活性を増加させる方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

- [30] 以下の(1)および(2)のいずれか一方のアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物の活性を増加させる方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

- [31] sc(Fv)2の重鎖可変領域と軽鎖可変領域が界面を形成しているアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含むsc(Fv)2組成物中の構造異性体の異性化反応を抑制する方法。

- [32] 以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に

置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の異性化反応を抑制する方法

。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域の39位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における38位に相当するアミノ酸残基

[33] 以下の(1)および(2)に記載のアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の異性化反応を抑制する方法

。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

[34] 以下の(1)および(2)のいずれか一方のアミノ酸残基を、電荷を有するアミノ酸残基に置換する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の異性化反応を抑制する方法。

(1) sc(Fv)2の重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、重鎖可変領域のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(2) sc(Fv)2の軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、軽鎖可変領域のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基

[35] sc(Fv)2のリンカーの長さを調節する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体の割合を調節する方法。

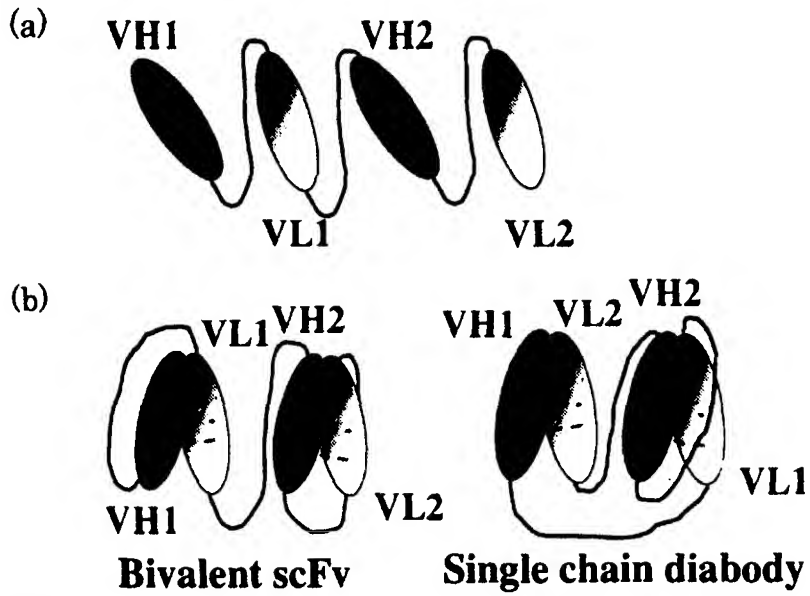
[36] 構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である請求項35に記載の方法。

[37] sc(Fv)2の両端のリンカーを0～12アミノ酸、中央のリンカーを10～30アミノ酸に調節する工程を含む、sc(Fv)2組成物中のsingle chain diabody型の割合を増加させる方法。

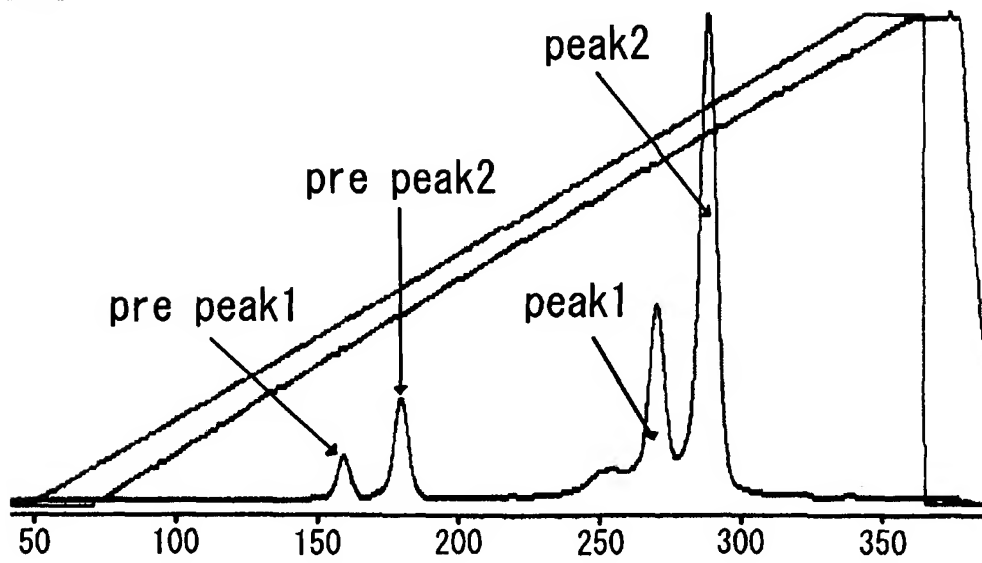
[38] sc(Fv)2の両端のリンカーを12～30アミノ酸、中央のリンカーを0～10アミノ酸に調節する工程を含む、sc(Fv)2組成物中のbivalent scFv型の割合を増加させる方法。

- [39] sc(Fv)2の両端のリンカーを0～12アミノ酸、中央のリンカーを0～10アミノ酸に調節する工程を含む、single chain diabody型の含有割合が80%以上であるsc(Fv)2組成物を製造する方法。
- [40] sc(Fv)2の両端のリンカーを12～30アミノ酸、中央のリンカーを0～10アミノ酸に調節する工程を含む、bivalent scFv型の含有割合が80%以上であるsc(Fv)2組成物を製造する方法。
- [41] sc(Fv)2のリンカー又はリンカー近傍領域を切断する工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体を分析する方法。
- [42] 酵素で処理することによりリンカー又はリンカー近傍領域を切断することを特徴とする請求項41に記載の方法。
- [43] 構造異性体がsingle chain diabody型又はbivalent scFv型である請求項41または42に記載の方法。
- [44] 以下の工程を含む、sc(Fv)2組成物中の構造異性体を分析する方法。
(a) sc(Fv)2組成物を酵素で処理する工程
(b) 処理後の生成物の分子量または構造を測定する工程

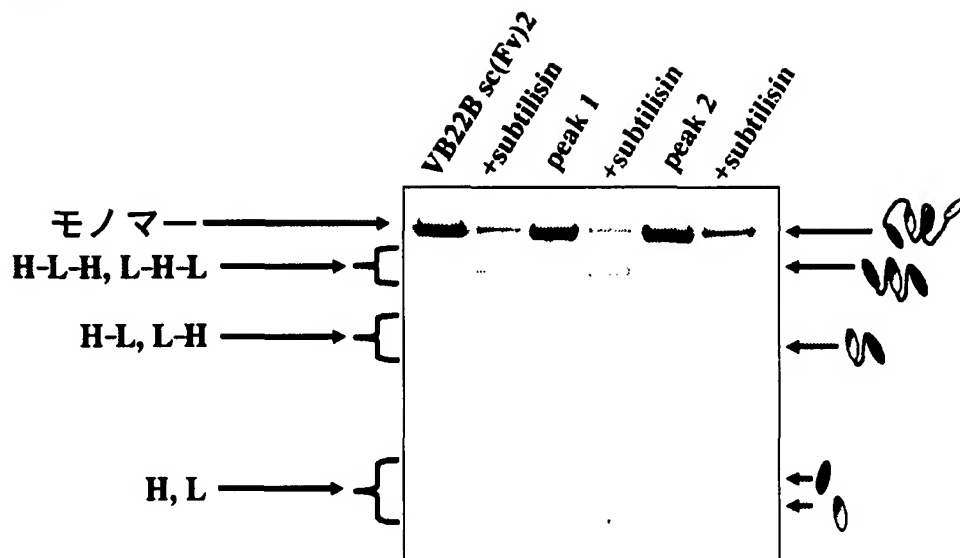
[図1]



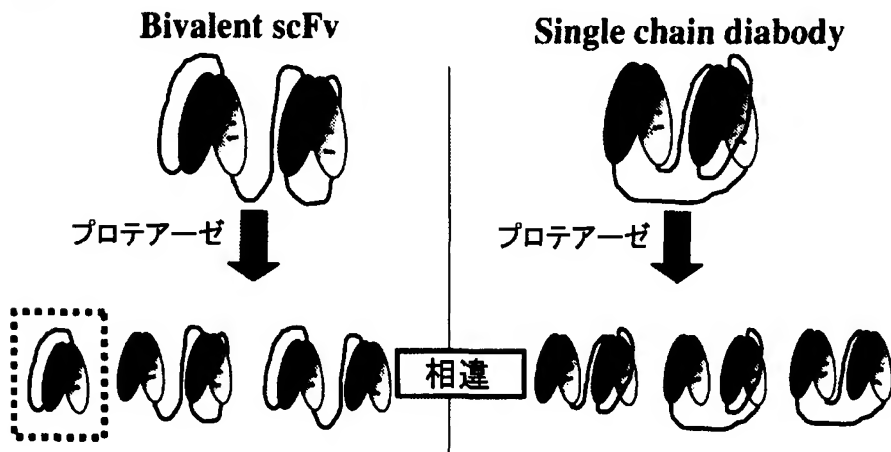
[図2]



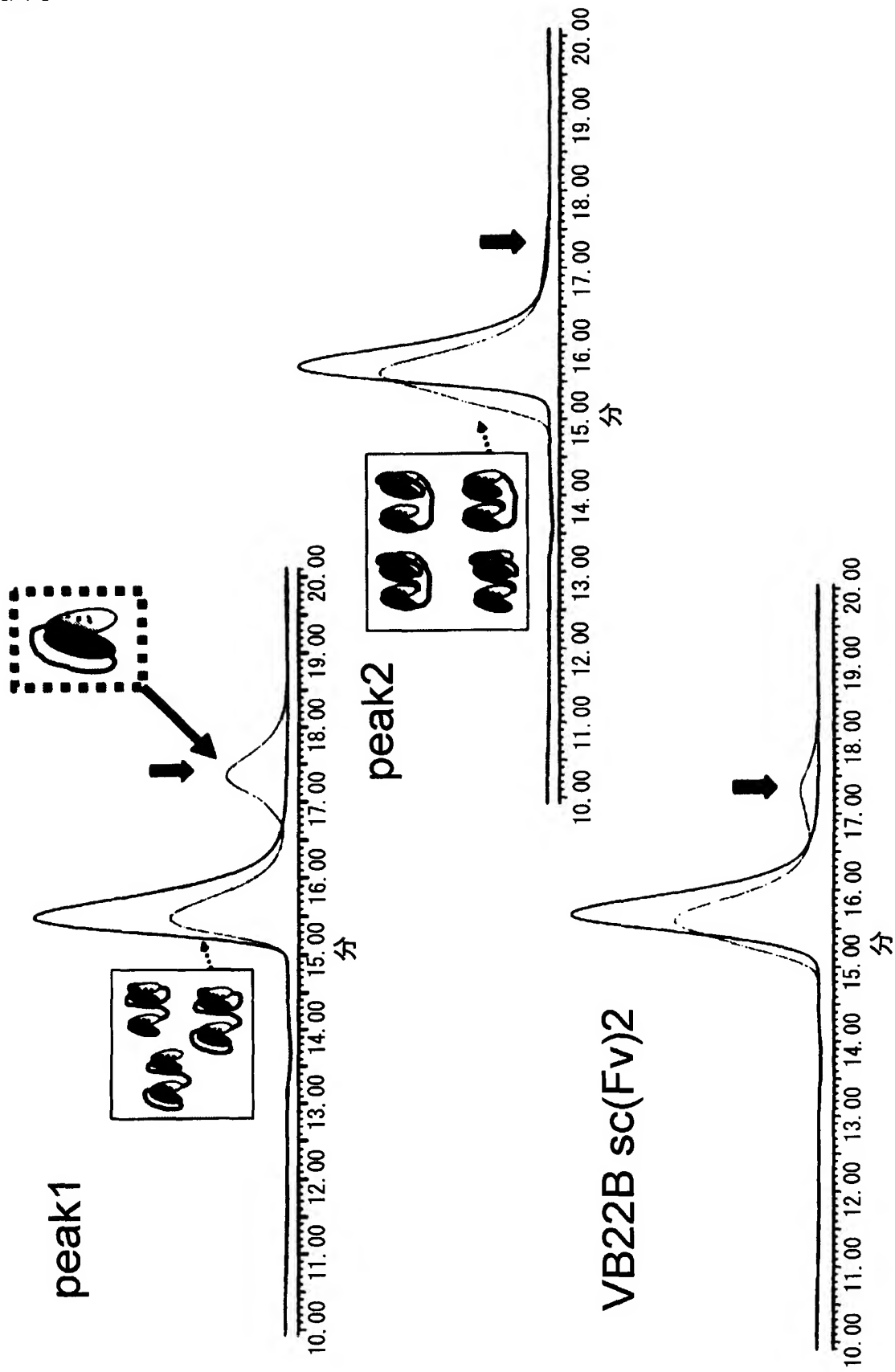
[図3]



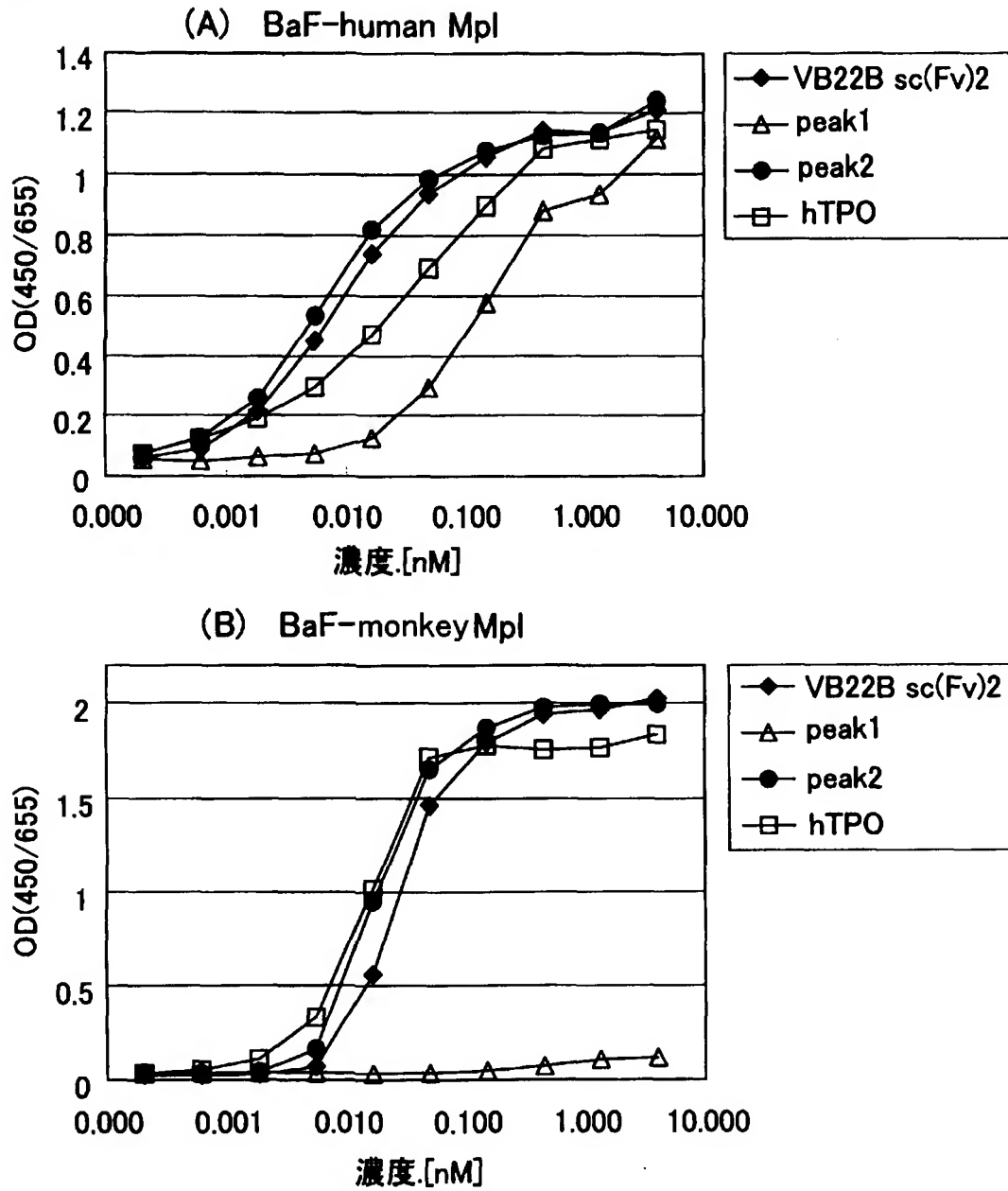
[図4]

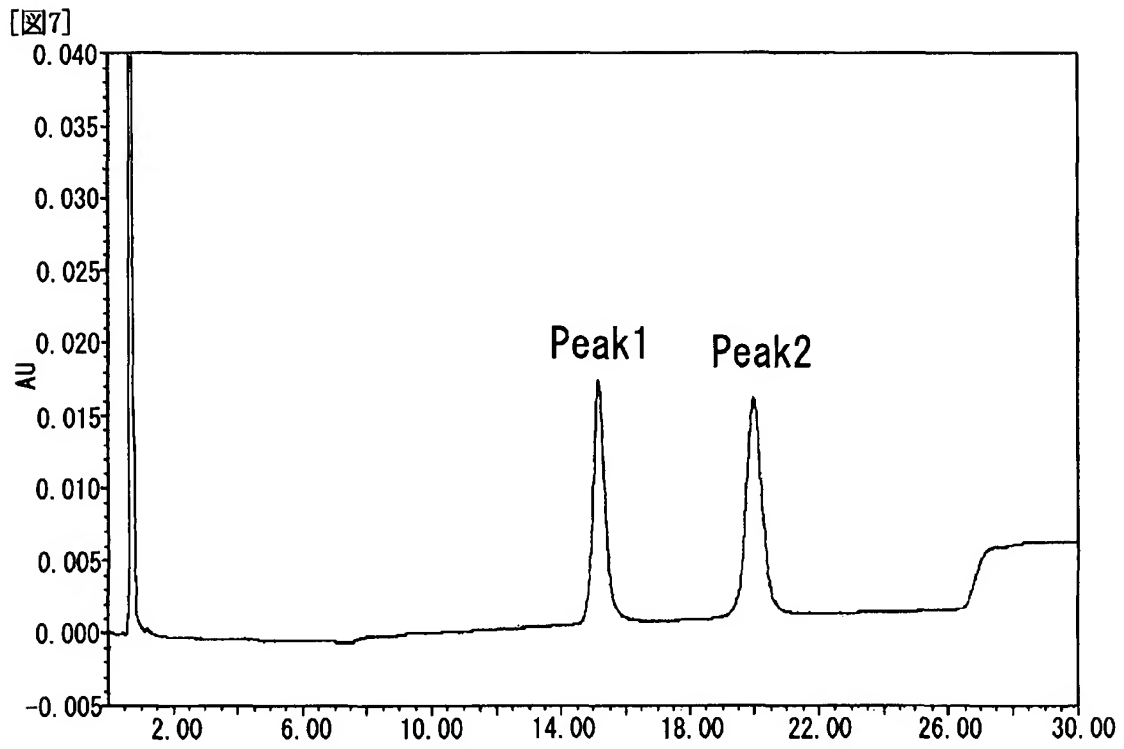


[図5]

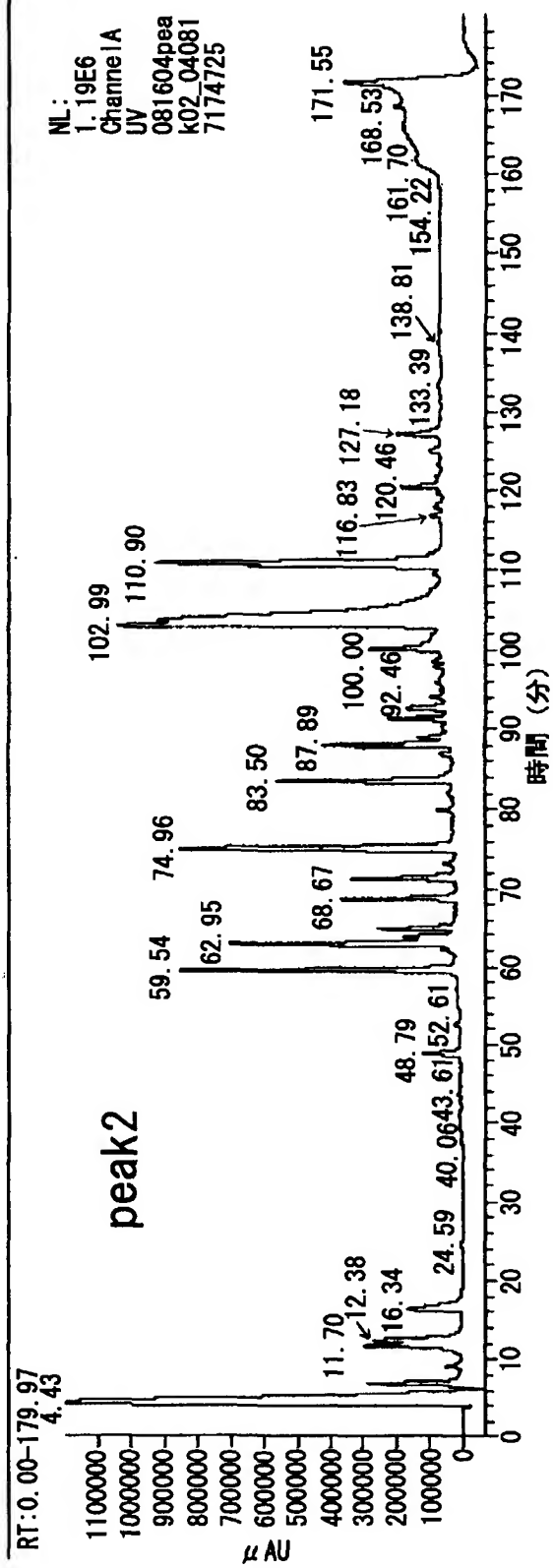
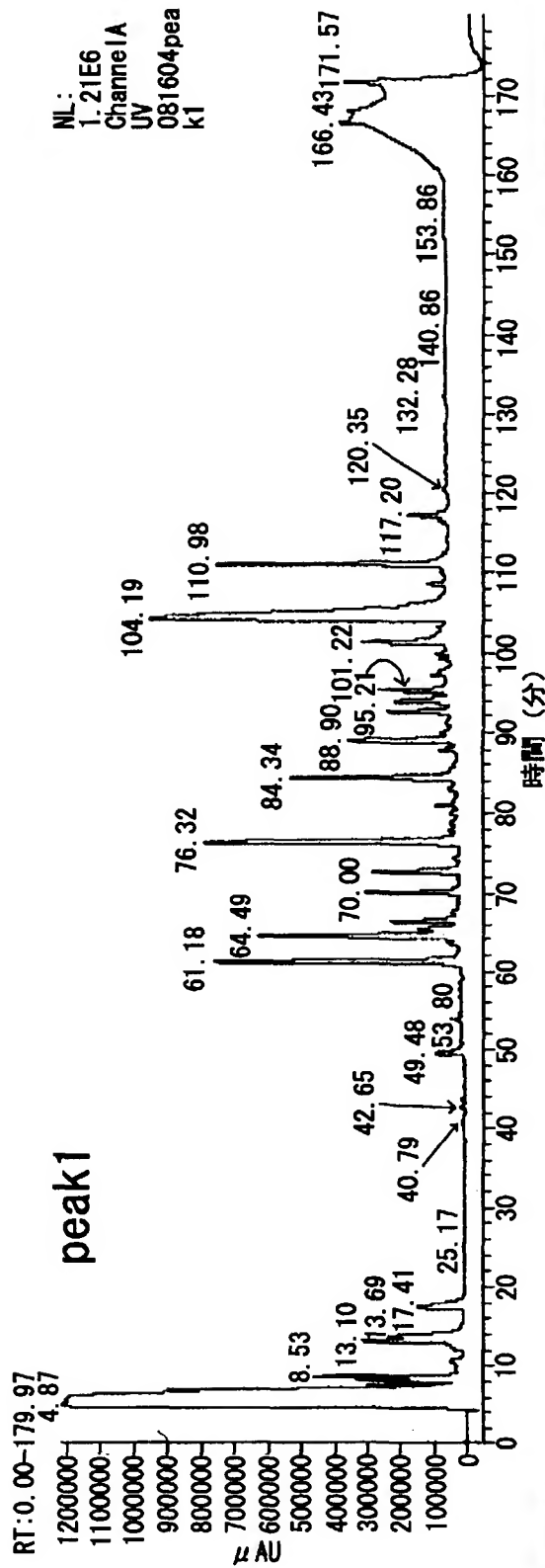


[図6]

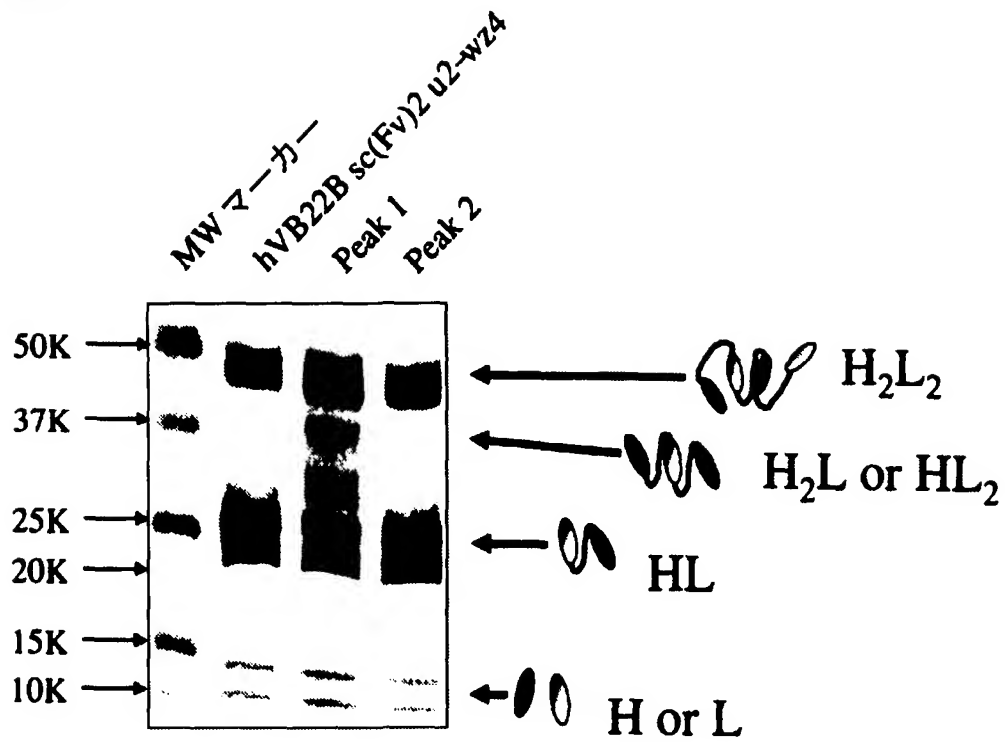




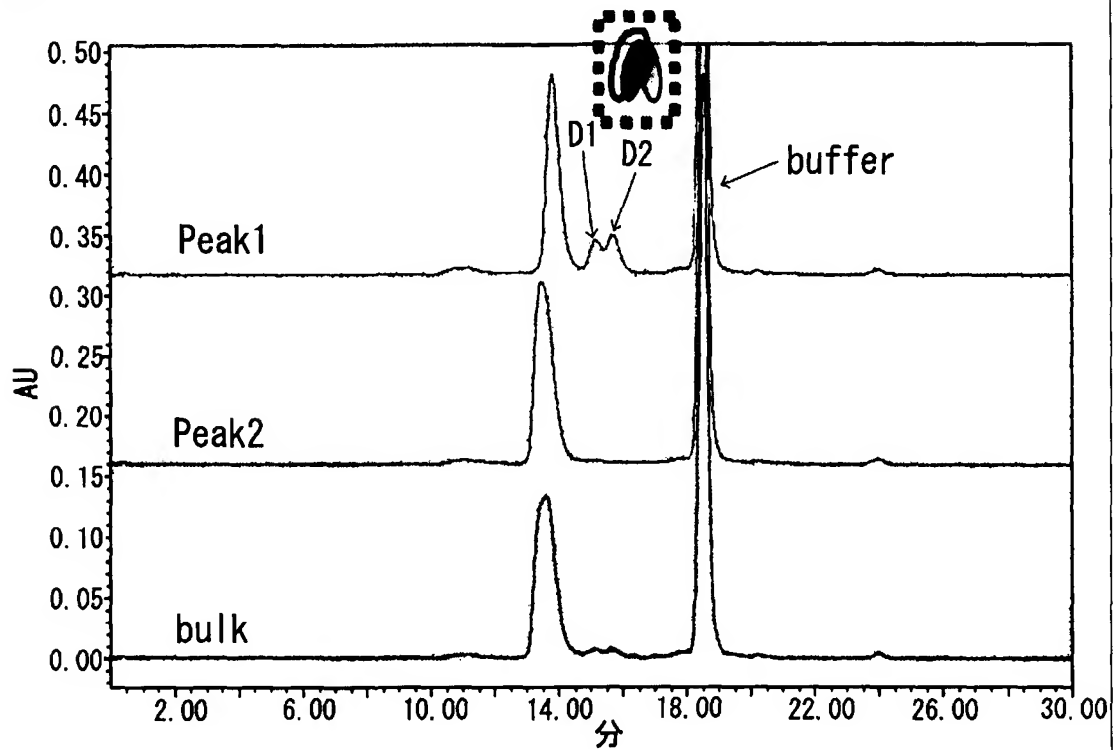
[図8]



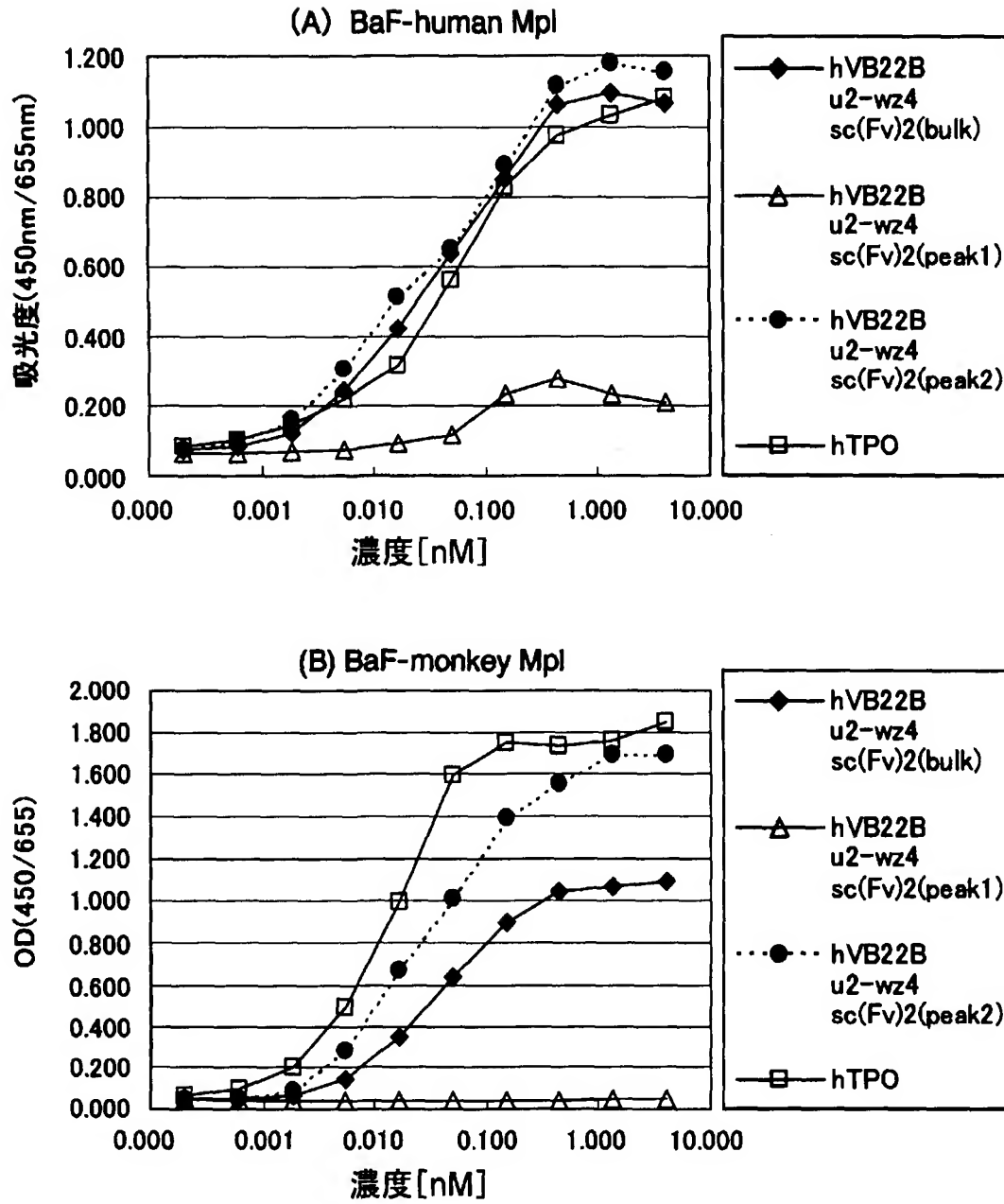
[図9]



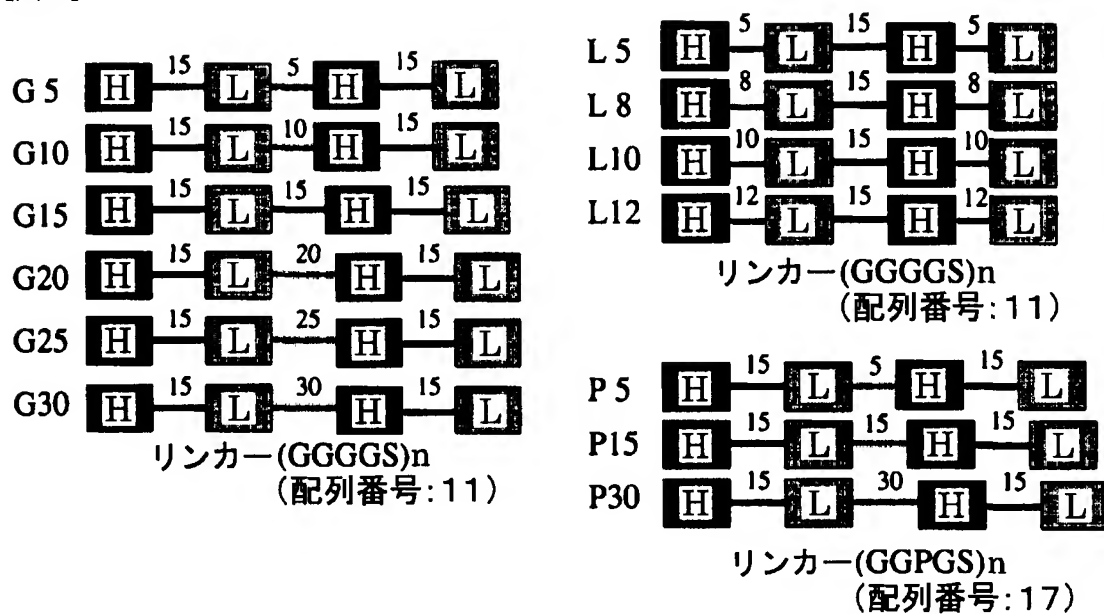
[図10]



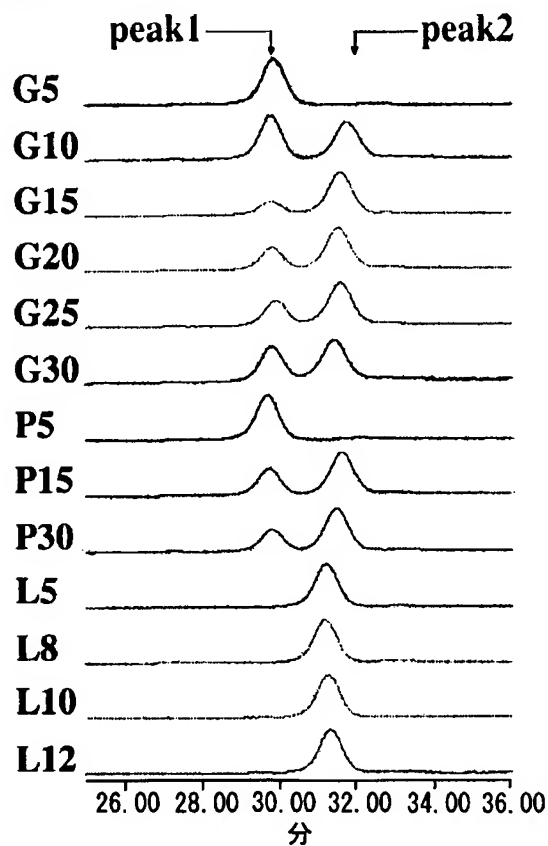
[図11]



[図12]

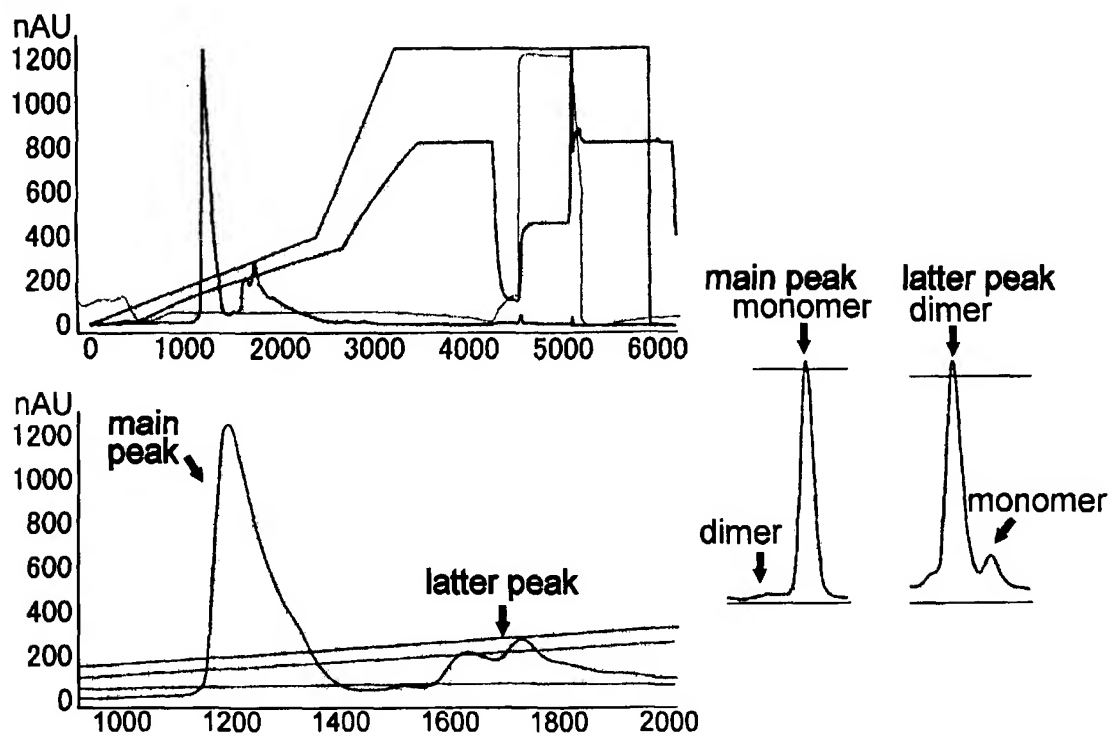


[図13]

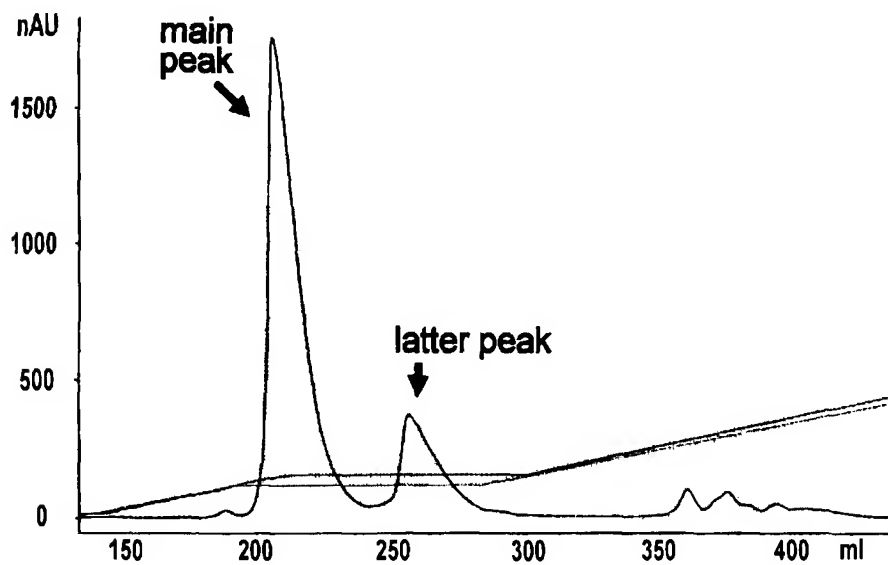


リンカー	bivalent scFv/%
G5	95
G10	51
G15	21
G20	31
G25	34
G30	42
P5	98
P15	35
P30	31
L5	0
L8	0
L10	0
L12	0

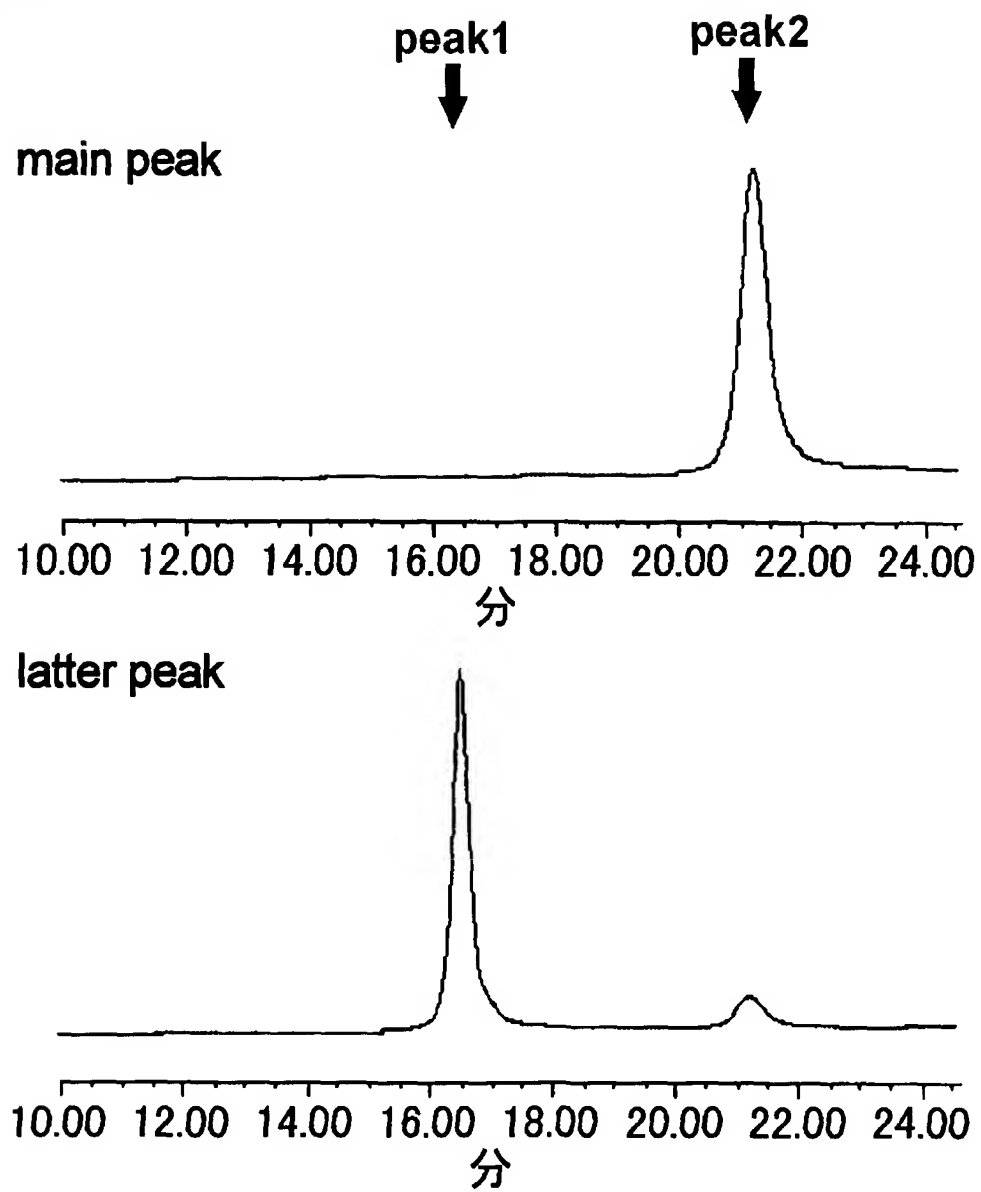
[図14]



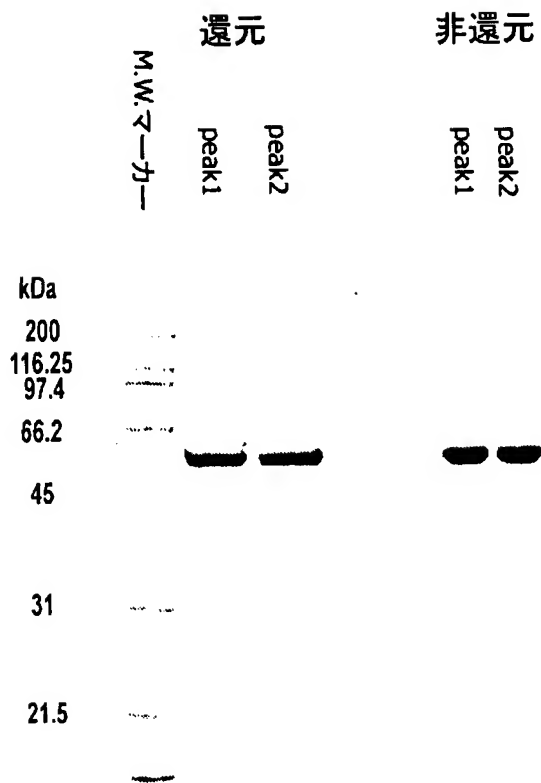
[図15]



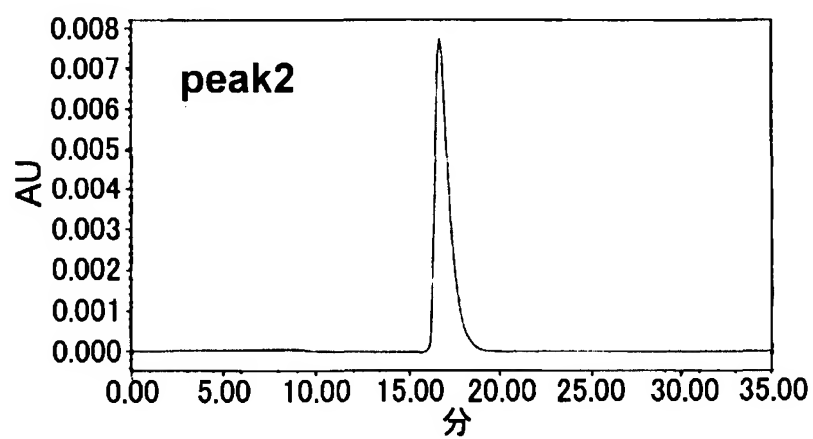
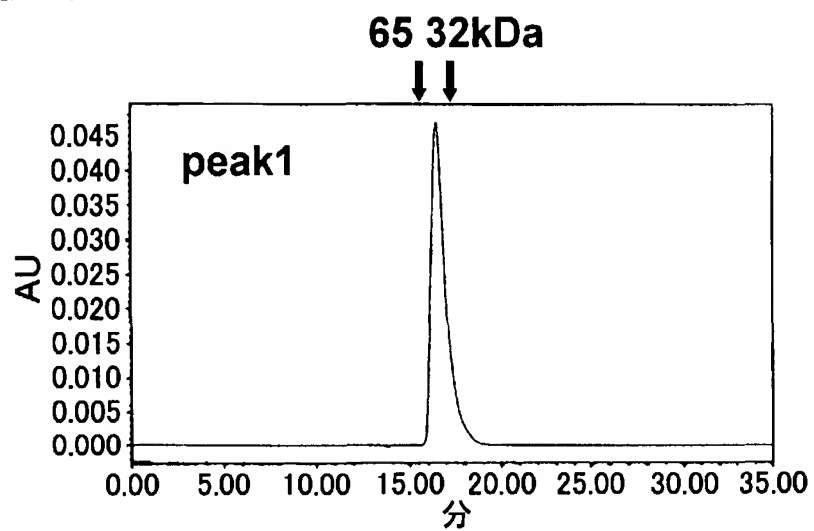
[図16]



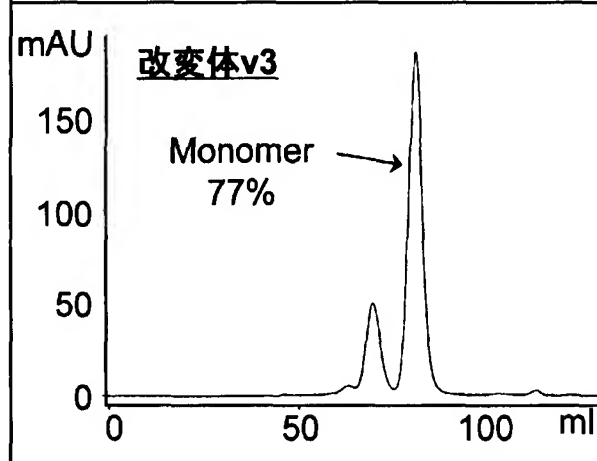
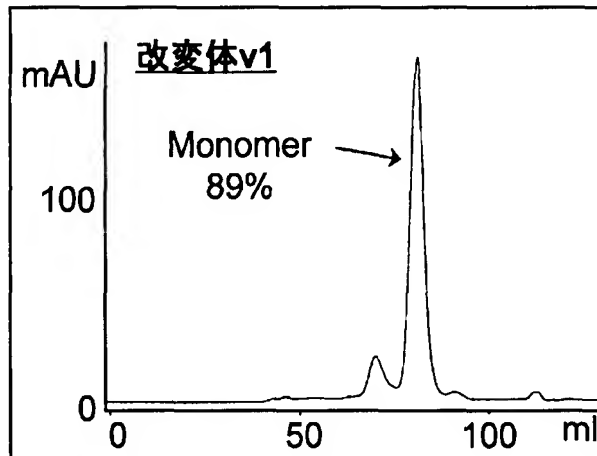
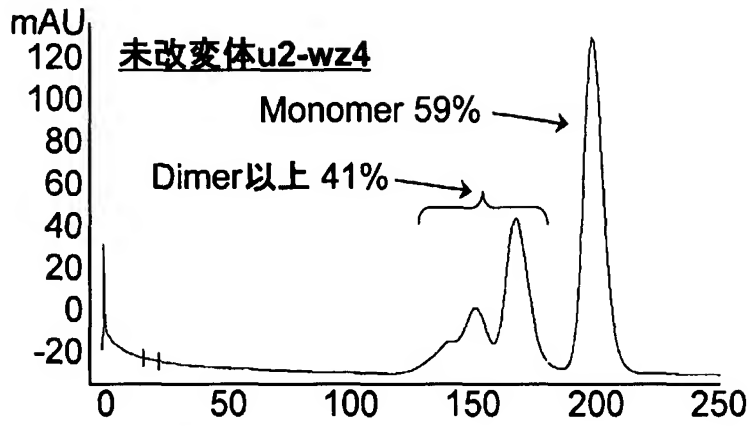
[図17]



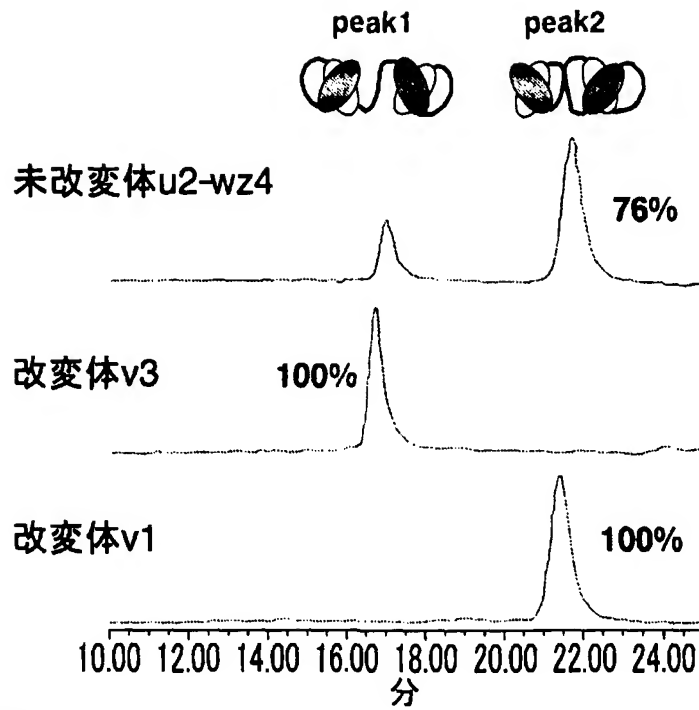
[図18]



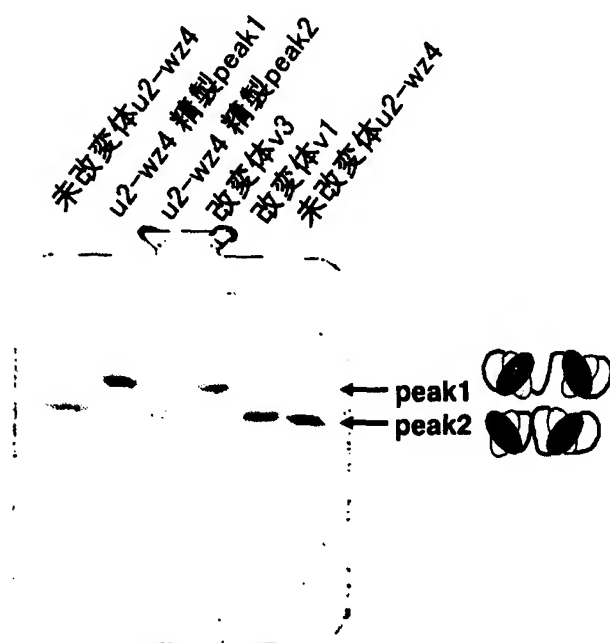
[図19]



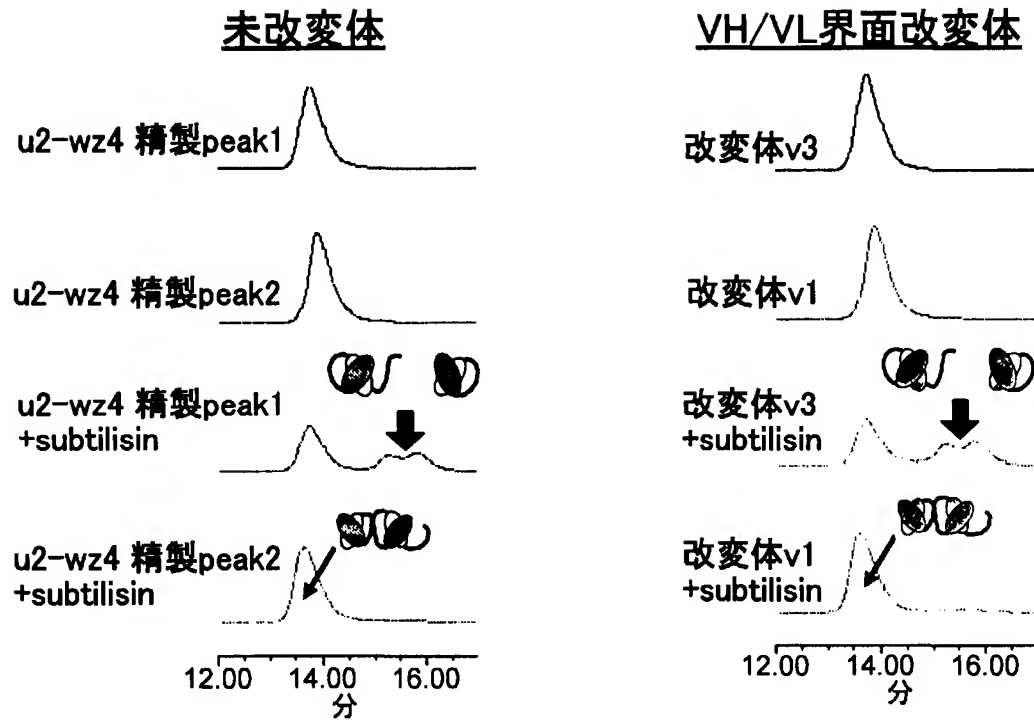
[図20]



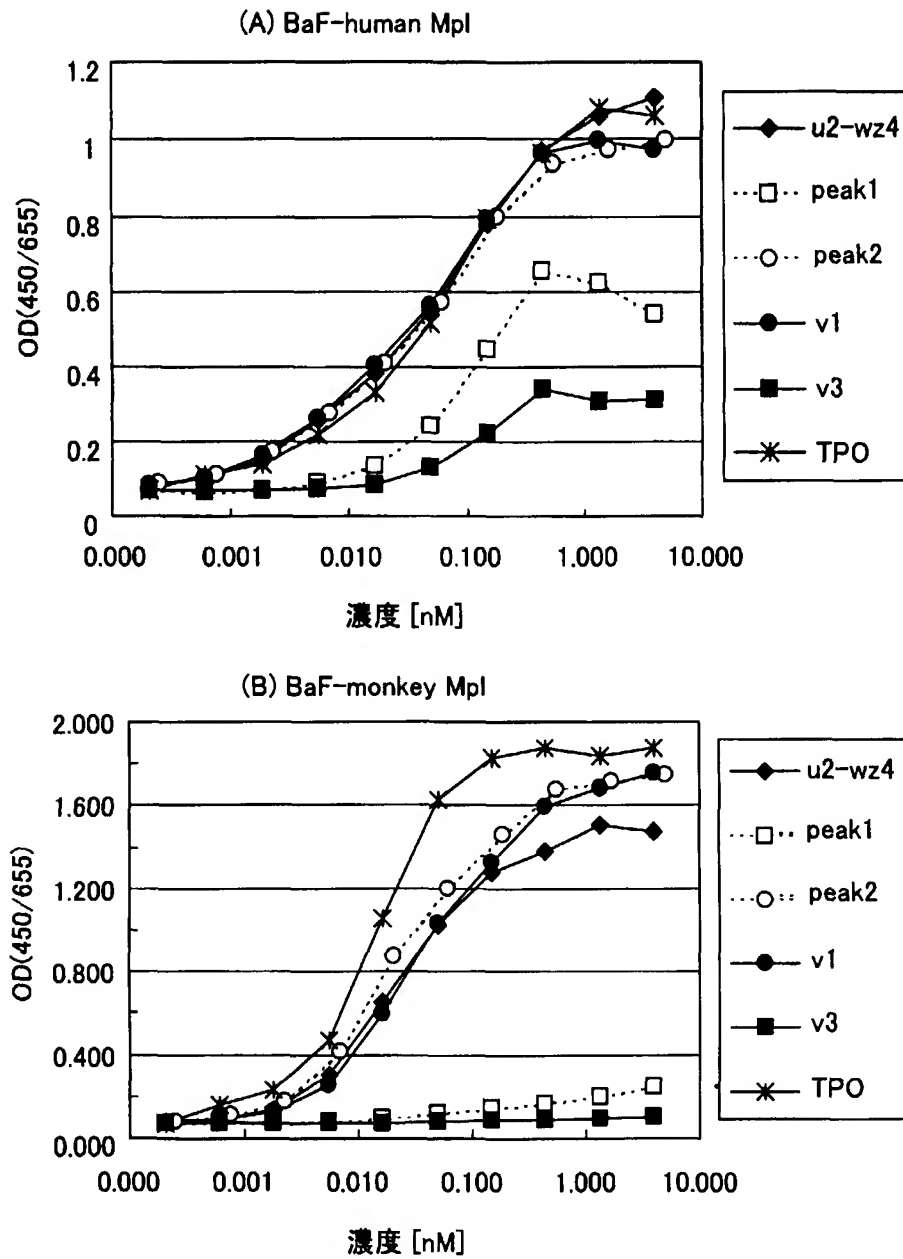
[図21]



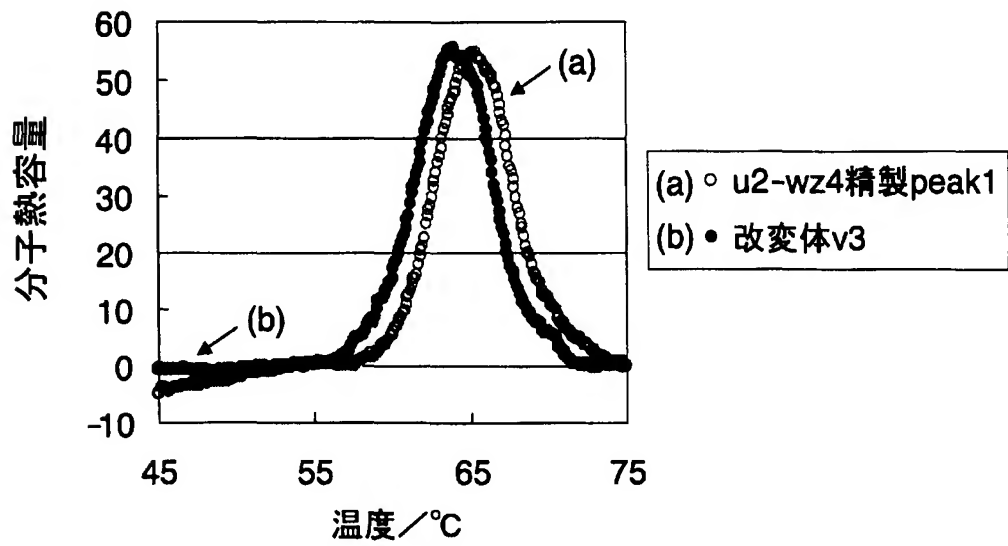
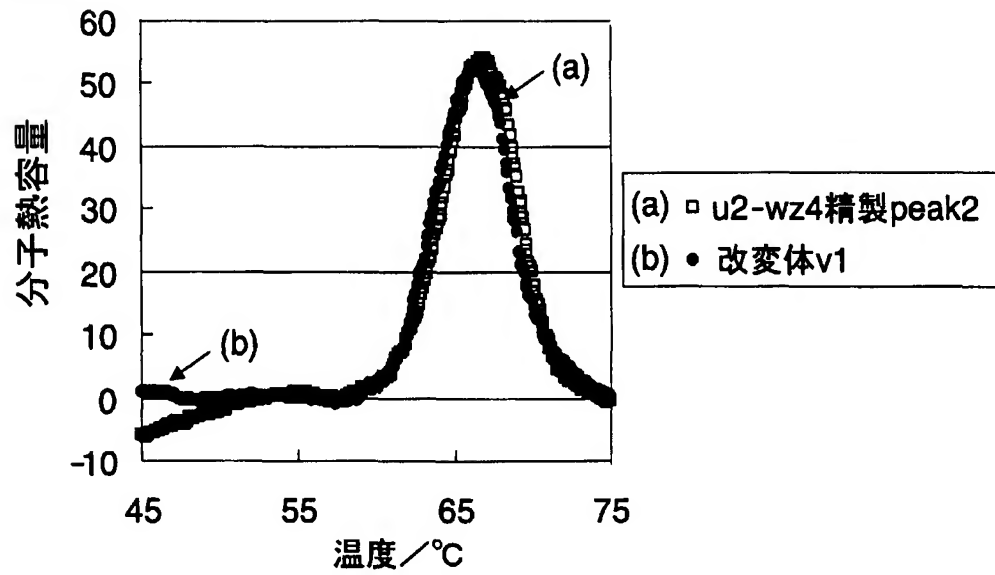
[図22]



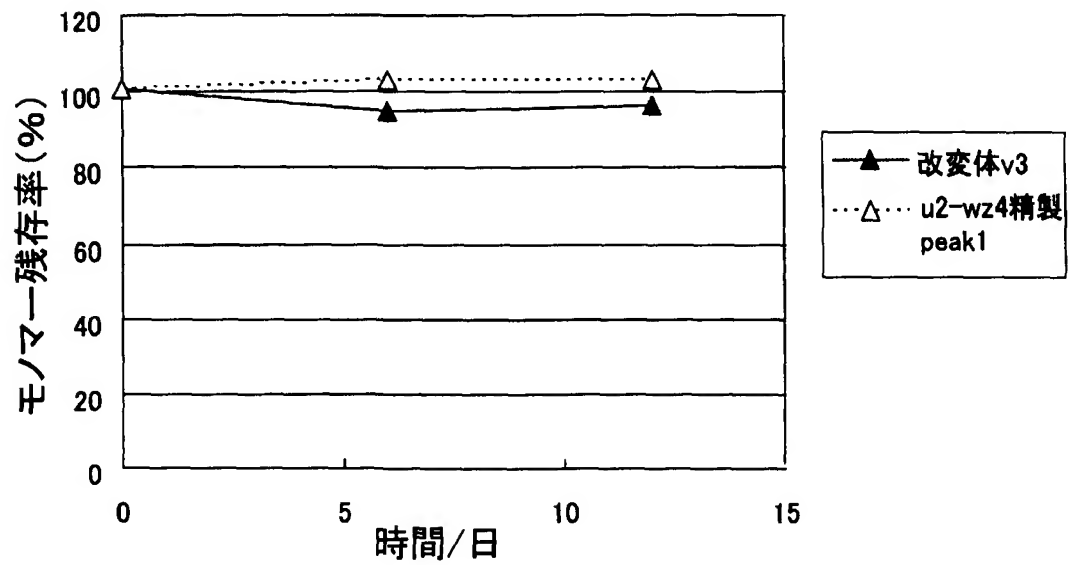
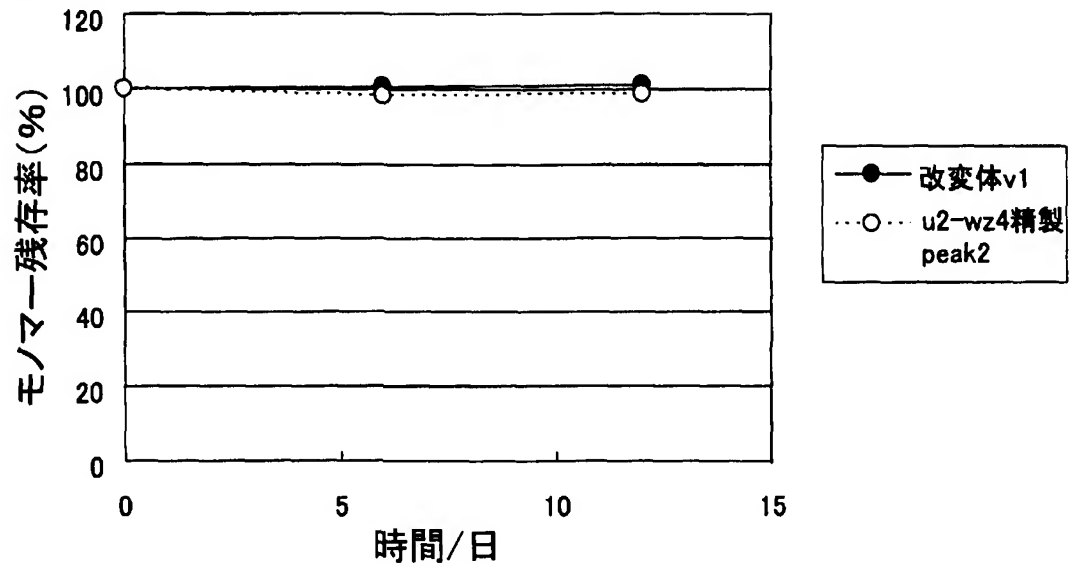
[図23]



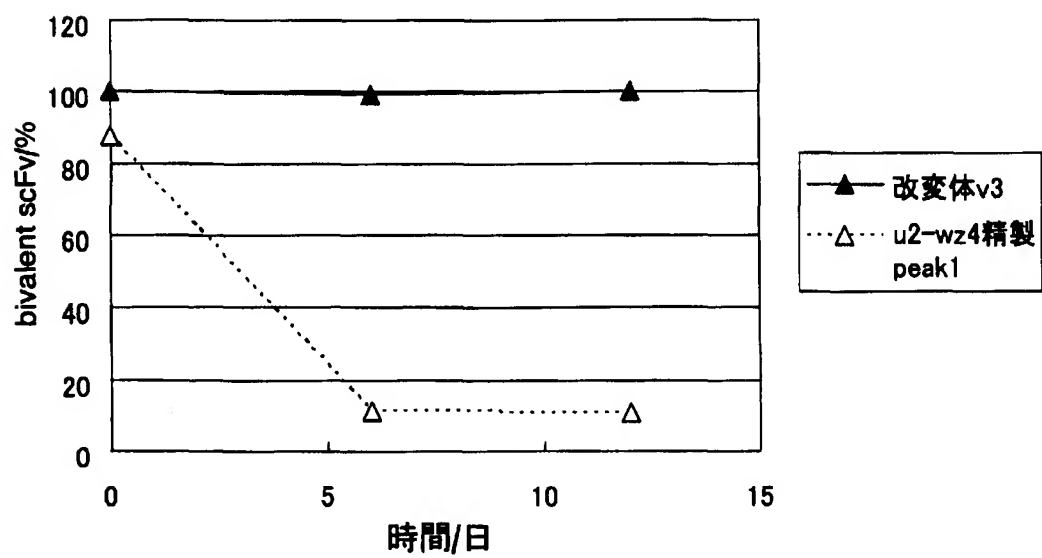
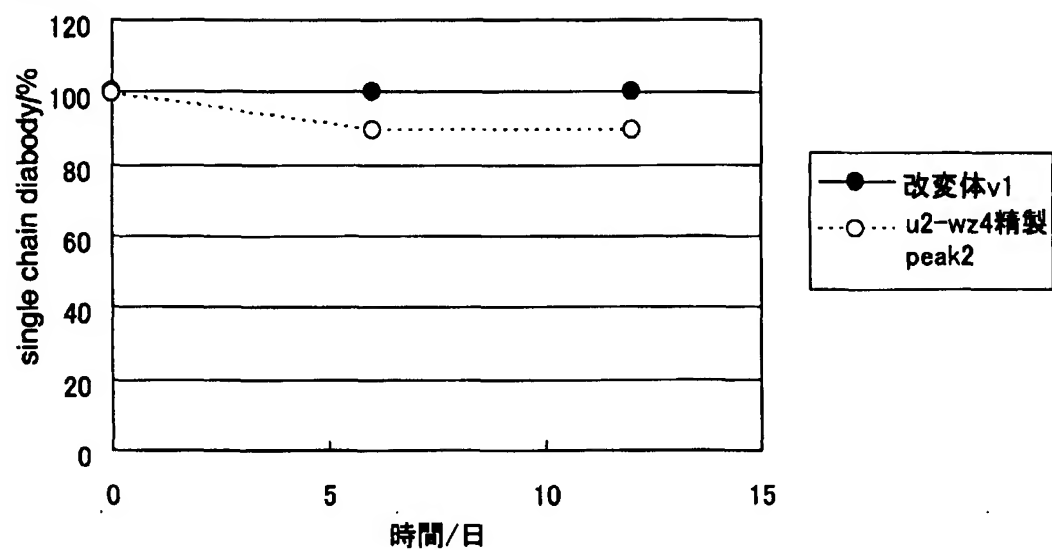
[図24]



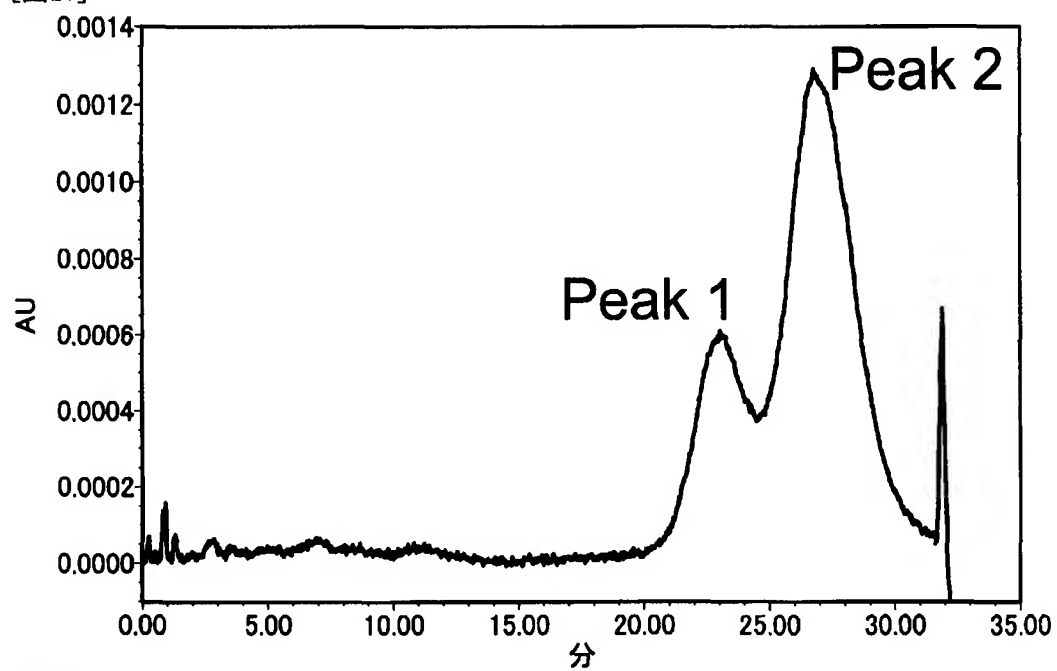
[図25]



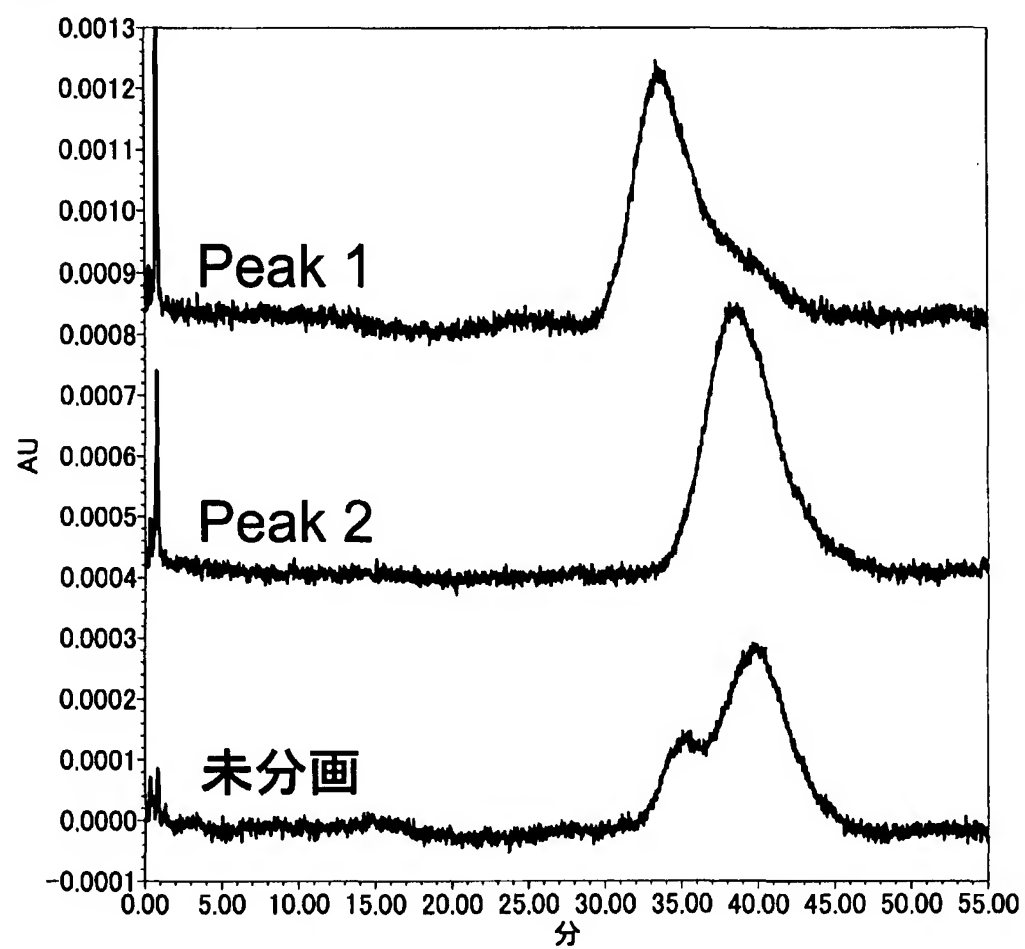
[図26]



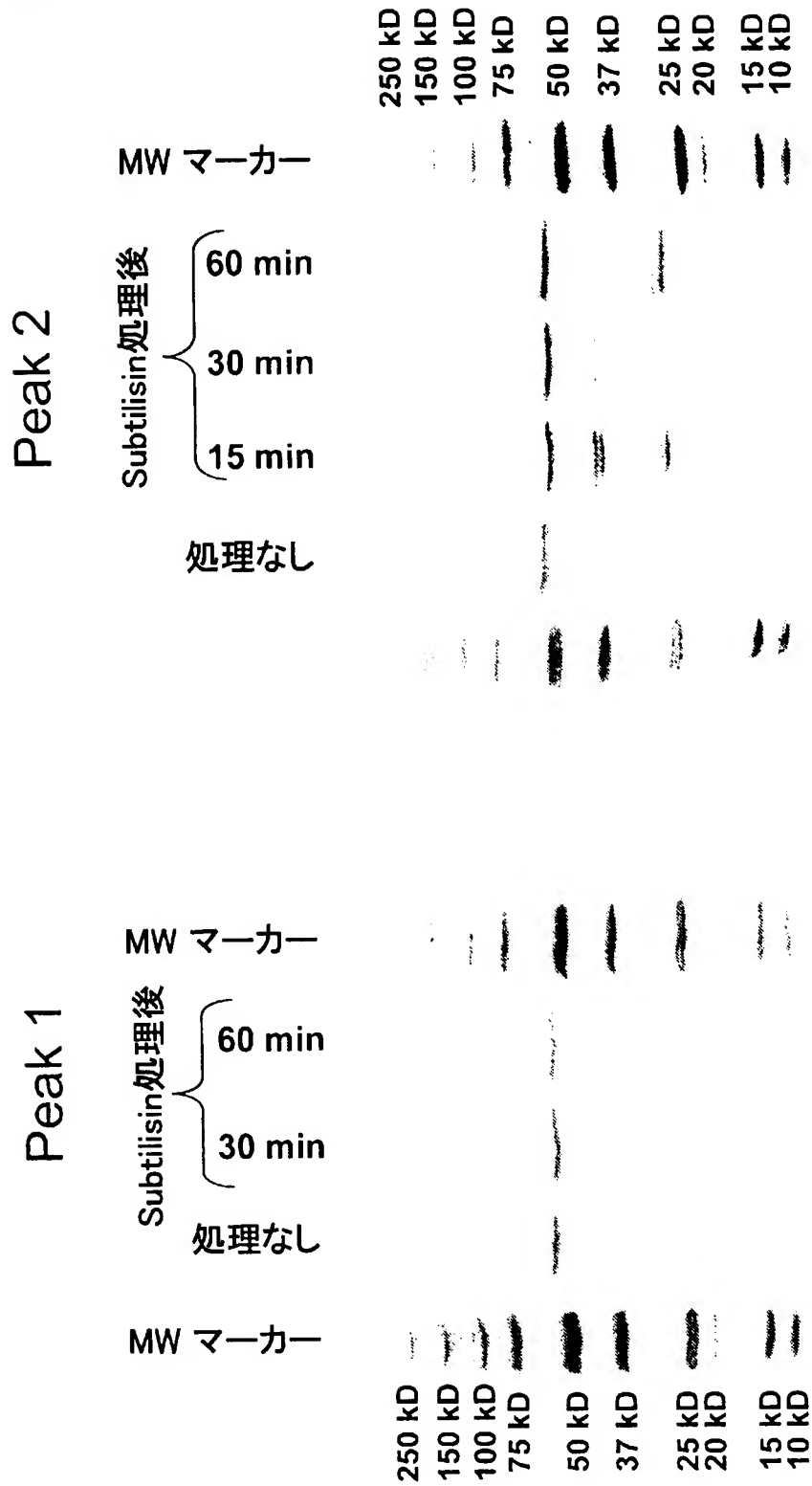
[図27]



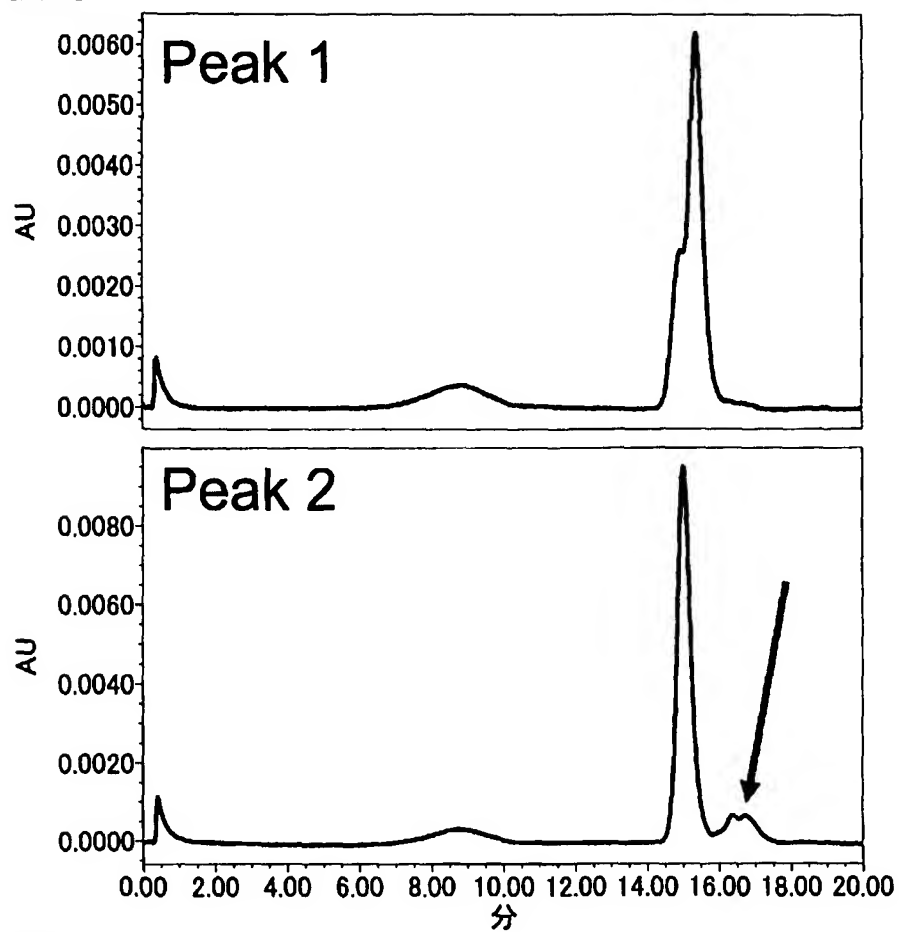
[図28]



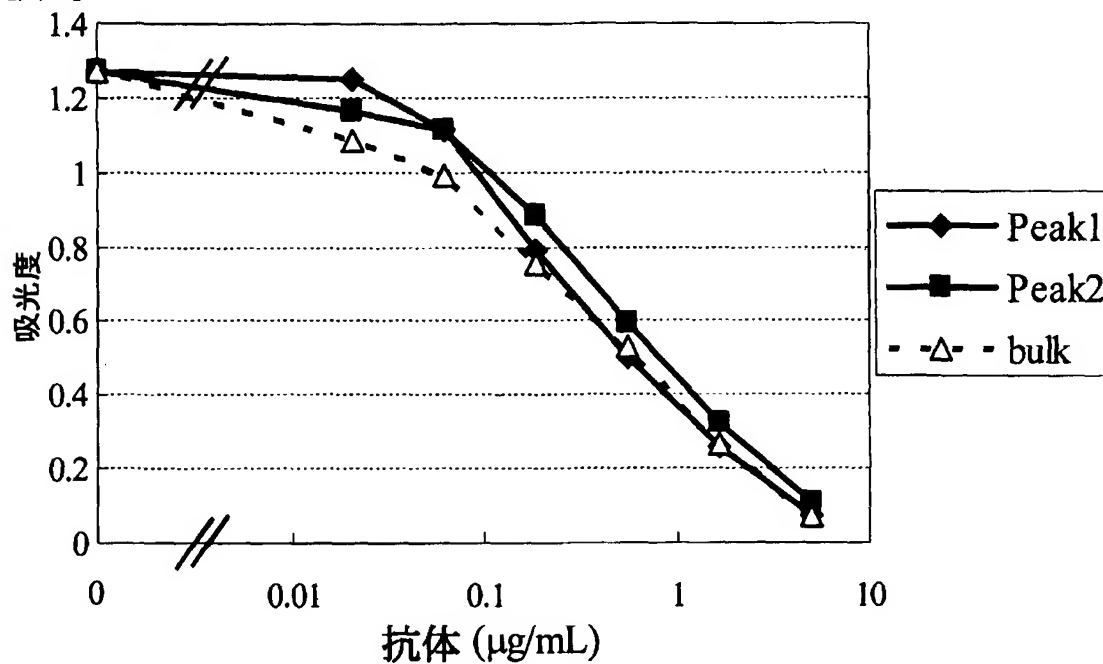
[図29]



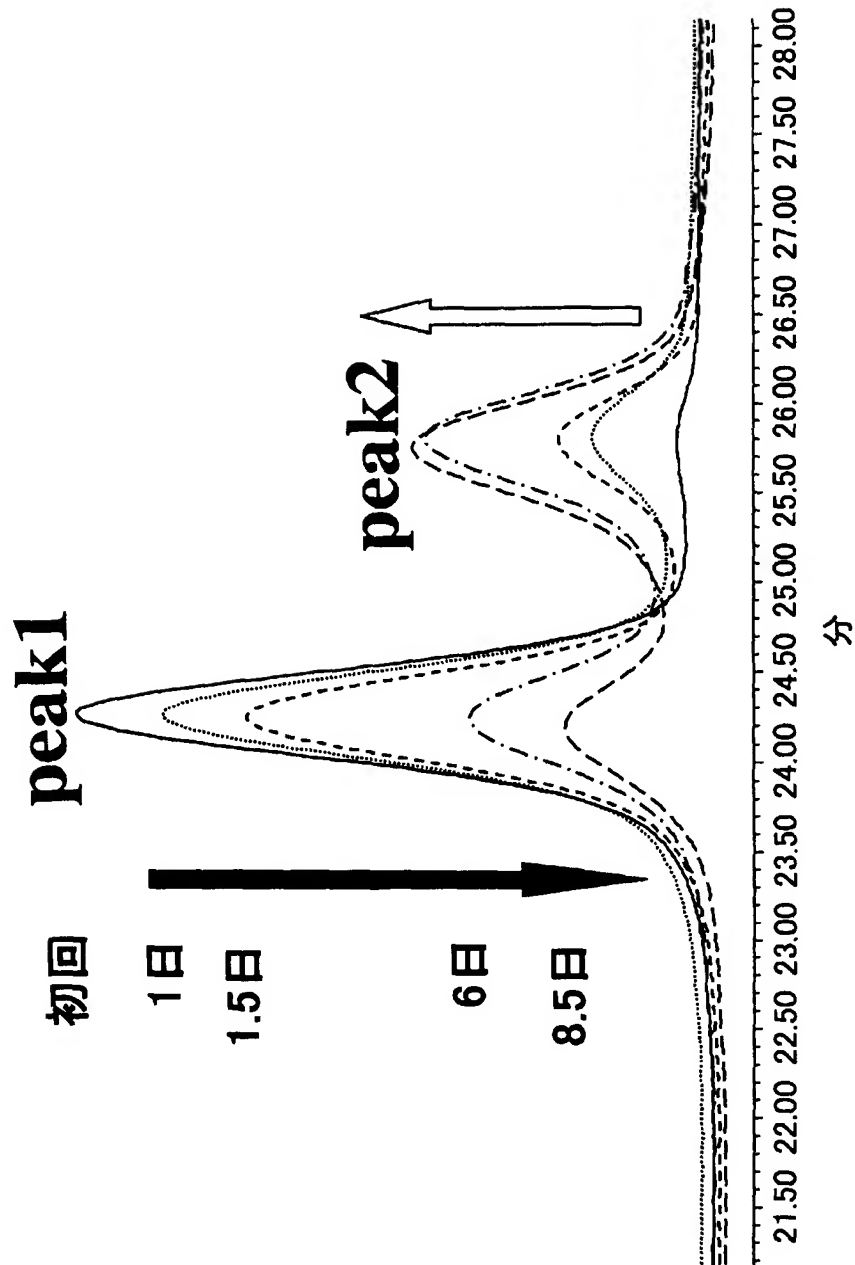
[図30]



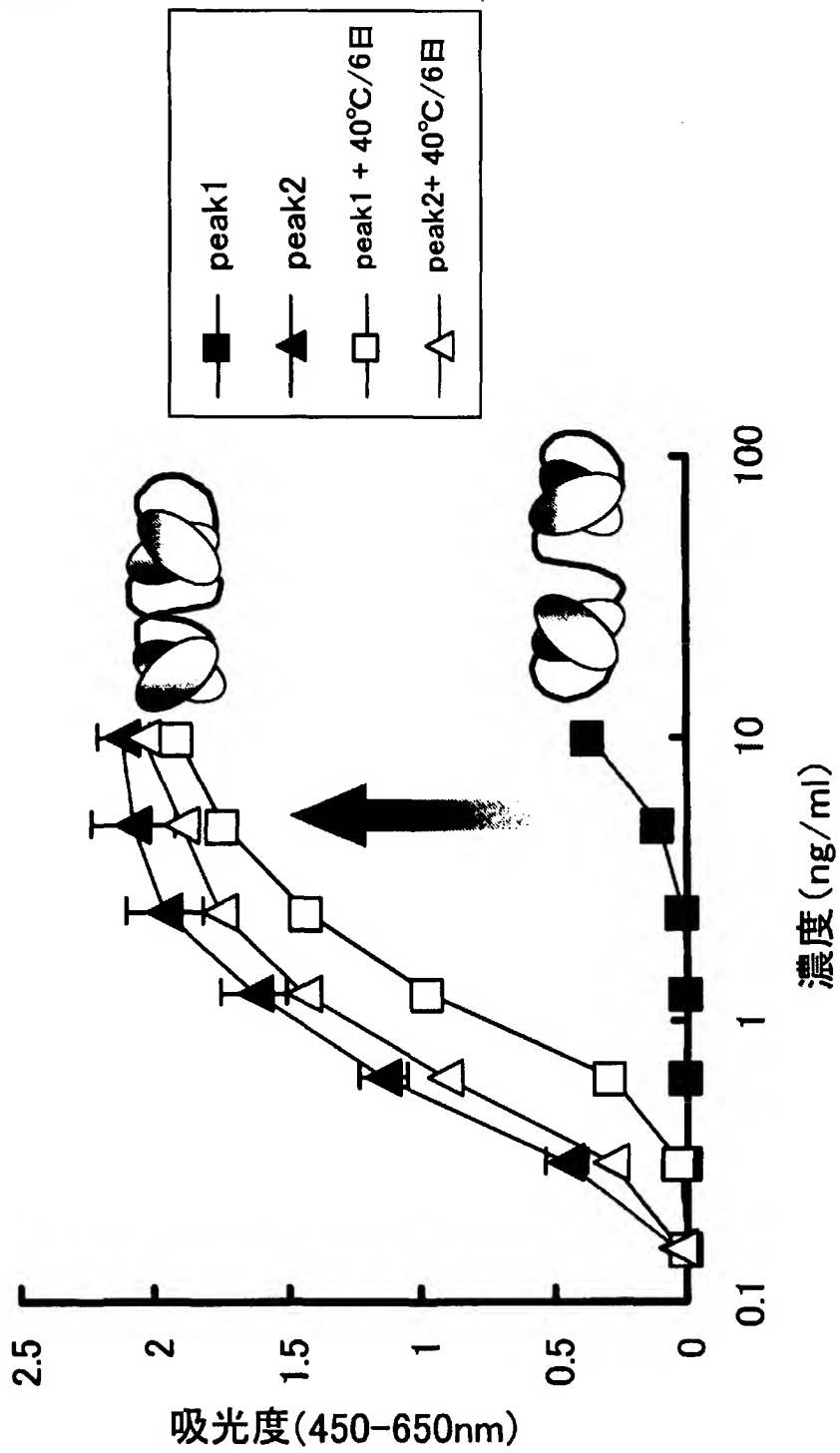
[図31]



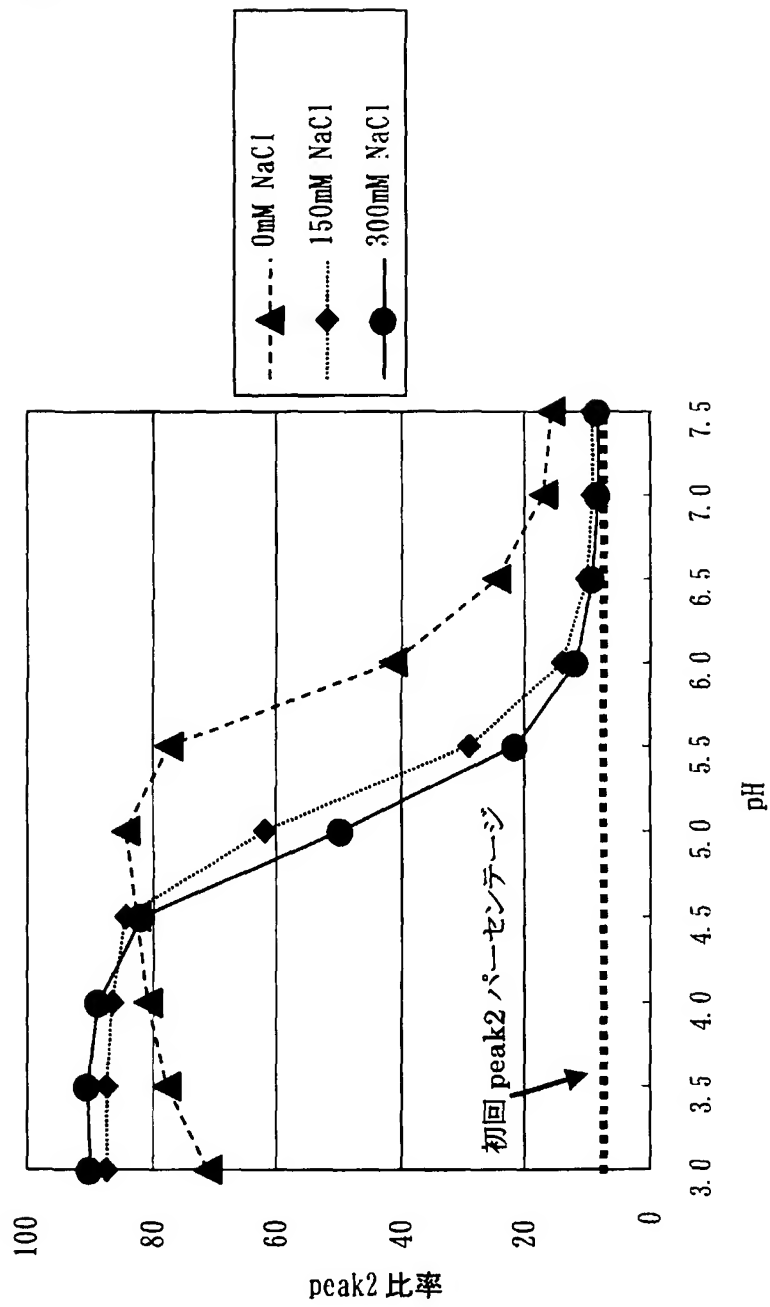
[図32]



[図33]



[図34]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01), A61K39/395(2006.01), C07K1/14(2006.01), C07K16/46(2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00-15/90, A61K39/395, C07K1/00-19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), Science Direct, JSTPlus(JDream2), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIPRIYANOV SM. et al., Effect of domain order on the activity of bacterially produced bispecific single-chain Fv antibodies., J.Mol.Biol., 2003, Vol.330, No.1, pages 99 to 111	1-44
Y	KRIANGKUM J. et al., Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies., Biomol. Eng., 2001, Vol.18, No.2, pages 31 to 40	1-44
Y	DE JONGE J. et al., In vivo retargeting of T cell effector function by recombinant bispecific single chain Fv (anti-CD3 x anti-idiotypic) induces long-term survival in the murine BCL1 lymphoma model., J.Immunol., 1998, Vol.161, No.3, pages 1454 to 1461	1-44

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 April, 2006 (28.04.06)Date of mailing of the international search report
16 May, 2006 (16.05.06)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306800

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MALLENDER WD. et al., Construction, expression, and activity of a bivalent bispecific single-chain antibody., J.Biol.Chem., 1994, Vol.269, No.1, pages 199 to 206	1-44
Y	MACK M. et al., A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 1995, Vol.92, No.15, pages 7021 to 7025	3,4,7,13, 23-43
Y	ORITA, T. et al., A novel therapeutic approach for thrombocytopenia by minibody agonist of the thrombopoietin receptor., Blood, 15 January, 2005 (15.01.05), Vol.105, No.2, pages 562 to 566	3,4,7,13, 23-43

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01), A61K39/395(2006.01), C07K1/14(2006.01), C07K16/46(2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/00-15/90, A61K39/395, C07K1/00-19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), Science Direct, JSTPlus(JDream2), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	KIPRIYANOV SM, et al., Effect of domain order on the activity of bacterially produced bispecific single-chain Fv antibodies., J Mol Biol., 2003, vol.330, no.1, p.99-111	1-44
Y	KRIANGKUM J, et al., Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies., Biomol Eng., 2001, vol.18, no.2, p.31-40	1-44

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.04.2006

国際調査報告の発送日

16.05.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

9358

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	DE JONGE J, et al., In vivo retargeting of T cell effector function by recombinant bispecific single chain Fv (anti-CD3 x anti-idiotypic) induces long-term survival in the murine BCL1 lymphoma model., J Immunol., 1998, vol.161, no.3, p.1454-1461	1-44
Y	MALLENDER WD, et al., Construction, expression, and activity of a bivalent bispecific single-chain antibody., J Biol Chem., 1994, vol.269, no.1, p.199-206	1-44
Y	MACK M, et al., A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity., Proc Natl Acad Sci USA., 1995, vol.92, no.15, p.7021-7025	3, 4, 7, 13, 23-43
Y	ORITA T, et al., A novel therapeutic approach for thrombocytopenia by minibody agonist of the thrombopoietin receptor., Blood, 2005.01.15, vol.105, no.2, p.562-566	3, 4, 7, 13, 23-43